



---

# Universidad de Buenos Aires

## Facultad de Medicina

Tesis de doctorado: Alteraciones conductuales inducidas por la exposición al ruido ambiental durante distintas etapas del desarrollo. Mediadores bioquímicos involucrados y estrategias de neuroprotección.

---

**Tesista:** Lic. Sonia Jazmín Molina

**Directora:** Dra. Laura Ruth Guelman

**Consejera de estudios:** Dra. Ana Belén Elgoyhen

**Año de presentación:** 2018

**Lugar donde se realizó la tesis:** 1ª Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA, CEFyBO-CONICET

# Índice

## Página

<b>1. Resumen</b>	<b>6</b>
<b>2. Antecedentes del tema en estudio</b>	<b>11</b>
2.1. Relevancia del tema de estudio	11
2.2. El hipocampo	12
2.2.1. Estructura y desarrollo	12
2.2.2. Funciones	16
2.3. La exposición al ruido y sus efectos	19
2.3.1. Efectos de la exposición al ruido sobre el sistema auditivo	21
2.3.2. Efectos extra-auditivos de la exposición al ruido	25
2.3.2.1. Efectos del ruido en individuos adultos	25
2.3.2.2. Efectos del ruido en individuos en desarrollo	27
2.4. El estrés oxidativo como un posible mecanismo mediante el cual la exposición al ruido podría causar daño celular	32
2.4.1. ¿Qué es el estrés oxidativo?	32
2.4.2. Alteraciones en el estado oxidativo de animales expuestos al ruido	34
2.5. Sistemas de neurotransmisión aminoacidérgicos: Otro posible mecanismo que podría estar implicado en los efectos perjudiciales del ruido	37
2.6. Las células gliales: la gliosis reactiva como mecanismo de defensa ante la excitotoxicidad	41
2.7. Ambiente enriquecido	42
<b>3. Objetivos e hipótesis: su relevancia y originalidad</b>	<b>53</b>
3.1. Significado y originalidad de la propuesta	53
3.2. Objetivos generales y específicos e hipótesis	53
<b>4. Los métodos y el diseño de los experimentos</b>	<b>57</b>
4.1. Animales	57
4.2. Exposición al ruido	60
4.3. Tests conductuales	61
4.3.1. Test de evitación inhibitoria (EI)	62
4.3.2. Campo Abierto (CA)	64

4.3.3. Laberinto en Cruz Elevado (LCE)	66
4.4. Potenciales evocados auditivos	68
4.5. Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS)	69
4.6. Medición de la actividad de catalasa	69
4.7. Evaluación histológica	70
4.8. Western Blot	71
4.9. Enriquecimiento ambiental con ejercitación física	72
4.10. Análisis estadístico	74
<b>5. Resultados</b>	<b>77</b>
5.1. Potenciales evocados auditivos	77
5.2. Resultados de pruebas conductuales	78
5.2.1. Evitación Inhibitoria (EI)	78
5.2.2. Campo Abierto (CA)	82
5.2.3. Laberinto en Cruz Elevado (LCE)	90
5.3. Determinación de ROS y Catalasa	101
5.4. Resultados de Western Blot	104
5.4.1. Niveles de Trx1 en el hipocampo	104
5.4.2. Niveles de Trx2 en hipocampo	108
5.4.3. Niveles de GAD 65/67 en hipocampo	111
5.4.4. Niveles de EAAT-1 en hipocampo	113
5.5. Resultados inmunohistoquímicos	116
5.6. Resumen de los resultados obtenidos	120
<b>6. Discusión</b>	<b>126</b>
6.1. Función auditiva	126
6.2. Comportamiento	128
6.2.1. Análisis de los efectos de la exposición al ruido a los 7 y 15 DPN sobre el comportamiento de animales de 28 DPN	128
6.2.1.1. Memoria	128
6.2.1.2. Comportamiento relacionado a la ansiedad y defensivo	133
6.2.2. Una semana de ambiente enriquecido como estrategia de neuroprotección	137

6.2.3. El ambiente enriquecido podría favorecer la expresión de ciertos fenotipos conductuales	139
6.2.4. Una semana más de vida, una semana más de AE: evaluación en ratas de 35 días	140
6.3. Estrés oxidativo	143
6.4. Neurotransmisión aminoacidérgica	150
6.5. Inmunohistoquímica	153
6.6. Relaciones entre los distintos hallazgos	155
<b>7. Conclusiones</b>	<b>163</b>
<b>8. Bibliografía</b>	<b>167</b>
<b>9. Abreviaturas</b>	<b>215</b>
<b>10. Agradecimientos</b>	<b>217</b>



# 1. Resumen

## **1. Resumen**

### **1.1. Resumen en castellano**

El desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC) se trata de un proceso muy complejo que puede verse alterado por diferentes estímulos ambientales que podrían estar involucrados en la progresión de diferentes patologías en etapas posteriores de la vida del individuo. El ruido constituye un ejemplo de un estímulo ambiental con capacidad de causar alteraciones en el SNC en desarrollo. En los últimos años, la exposición al ruido ambiental ha resultado un importante problema de salud pública capaz de poner en riesgo la salud física y psicológica de las personas. En consecuencia, el objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos de la exposición al ruido durante el desarrollo en un modelo animal sobre diferentes parámetros conductuales, bioquímicos e histológicos relacionados al hipocampo (HC), una estructura implicada en diversas funciones cognitivas y que ha mostrado ser susceptible al daño de diferentes injurias ambientales. Asimismo, se estudiaron los efectos del ambiente enriquecido (AE) como una posible estrategia de neuroprotección no farmacológica.

Ratas Wistar fueron expuestas al ruido a diferentes edades en el desarrollo temprano y durante distintos periodos de tiempo. Luego del destete, los animales fueron alojados en jaulas normales o AEs durante una o dos semanas. Se evaluaron parámetros conductuales relacionados al HC, así como diferentes mediadores bioquímicos e histológicos de esta estructura, a diferentes tiempos post-exposición.

Se encontró que la exposición al ruido puede generar alteraciones: a) conductuales, como la memoria asociativa del miedo y la memoria de habituación, la actividad exploratoria, el comportamiento relacionado a la ansiedad y de evaluación de riesgos; b) bioquímicos, como los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS), tiorredoxinas 1 y 2 (Trx1 y Trx2), la enzima GAD 65/67 y el transportador de glutamato EAAT-1, así como en la actividad enzimática de catalasa; c) histológicos, como la proteína ácida fibrilar (GFAP). Por otra parte, el AE fue capaz de prevenir la mayoría de estas alteraciones.

En consecuencia, el presente trabajo podría contribuir al conocimiento de las alteraciones que puede producir la exposición temprana al ruido, así como de los mecanismos que podrían subyacer a dichas alteraciones. Además, podría favorecer el uso de estrategias de neuroprotección, como el AE, con el objeto de contrarrestar los daños inducidos. El conocimiento de los mecanismos implicados en el daño, así como de estrategias que permitan prevenir dichas alteraciones, resultan de relevancia clínica ante un problema de la salud pública que se encuentra en aumento en las sociedades urbanizadas.

Palabras clave: Ruido, hipocampo, comportamiento, desarrollo, enriquecimiento ambiental.

## 1.2. Resumen en inglés,

Development of Central Nervous System (CNS) constitutes a very complex process that may be affected by different environmental stimuli that could be involved in the progression of different pathologies in later stages of life. Noise is an example of an environmental stimulus capable to affect developing CNS. In recent years, exposure to environmental noise has been an important public health problem that could threaten physical and psychological health. Consequently, the aim of this work was to evaluate the effects of noise exposure at early developmental ages in an animal model on different behavioral, biochemical and histological parameters related to the hippocampus (HC), a structure involved in several cognitive functions and that had been sensitive to the damage of different environmental insults. Likewise, the effects of the enriched environment (EE) were studied as a possible non-pharmacological neuroprotection strategy.

Wistar rats were exposed to noise at different developmental ages and for different periods of time. After weaning, animals were housed in standard cages or EE for one or two weeks. Behavioral parameters related to HC were evaluated, as well as different biochemical and histological mediators of this structure, at different post-exposure times.

Results showed that noise exposure can induce: a) behavioral changes, such as associative and habituation memory deficits, as well as exploratory activity, risk assessment and anxiety-like behavior alterations; b) biochemical changes, such as modifications in the levels of reactive oxygen species (ROS), thioredoxins 1 and 2 (Trx1 and Trx2), GAD 65/67 enzyme and the glutamate transporter EAAT-1, as well as the enzymatic activity of catalase; c) histological changes, including glial fibrillar acid protein (GFAP) alterations. On the other hand, EE was able to prevent most of these changes.

In consequence, the present work could contribute to the knowledge about the effects of early noise exposure, as well as to understand the mechanisms that could underlie such changes. In addition, it could promote the use of EE as a neuroprotection strategy, in order to counteract the induced damage. Knowledge of the mechanisms involved in damage, as well as the use of strategies to prevent



these alterations, are of clinical relevance, facing a public health problem that is increasing in urbanized societies.

Keywords: Noise, hippocampus, behavior, development, environmental enrichment.

A faint, stylized background image of a neuron, showing its cell body and branching processes.

## **2. Antecedentes del tema de estudio**

## **2. Antecedentes del tema en estudio**

### **2.1. Relevancia del tema de estudio**

El estudio del desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC) ha adquirido gran relevancia en las últimas décadas, dado que se trata de un proceso muy complejo que puede verse alterado por diferentes estímulos del ambiente que podrían estar involucrados en la progresión de diferentes patologías en etapas posteriores de la vida del individuo (Jauregui-Huerta et al., 2011; Kolb et al., 2014; Ruvalcaba-Delgadillo et al., 2015). Más aún, se ha planteado que el impacto de estímulos adversos durante la maduración del cerebro pueden conducir a trastornos neurofisiológicos y conductuales frecuentemente relacionados con la etiología de distintos trastornos psiquiátricos (Llorente et al., 2012).

El desarrollo del SNC se inicia durante la gestación, continúa durante el periodo post-natal y se prolonga hasta la adolescencia. A lo largo de su desarrollo, el SNC atraviesa diferentes etapas que incluyen procesos de migración y diferenciación celular, sinaptogénesis y poda de conexiones, apoptosis y mielinización (Bear et al., 2001; Kolb et al., 2014). Además, cada región del SNC experimenta una maduración temporal independiente, así como diferentes ventanas temporales de vulnerabilidad, donde se encuentran más sensibles a la estimulación del ambiente. En este sentido, si bien la plasticidad neuronal y el desarrollo prolongado del cerebro favorecen una modificación continua de la función cognitiva, también crean una susceptibilidad potencial a la formación de circuitos anormales que pueden conducir a una función conductual alterada (Rice & Barone, 2000), pudiendo ser provocado, al menos en parte, por estímulos ambientales.

El ruido constituye un ejemplo de un estímulo ambiental con capacidad de causar alteraciones en el SNC en desarrollo. En los últimos años, la exposición al ruido ambiental se ha transformado en un importante problema de salud pública que pone en riesgo la salud física y psicológica de las personas que se encuentran en áreas urbanas (NIOSH, 1998; Morata et al., 2001; WHO, 2009, 2011; Kim et al.,

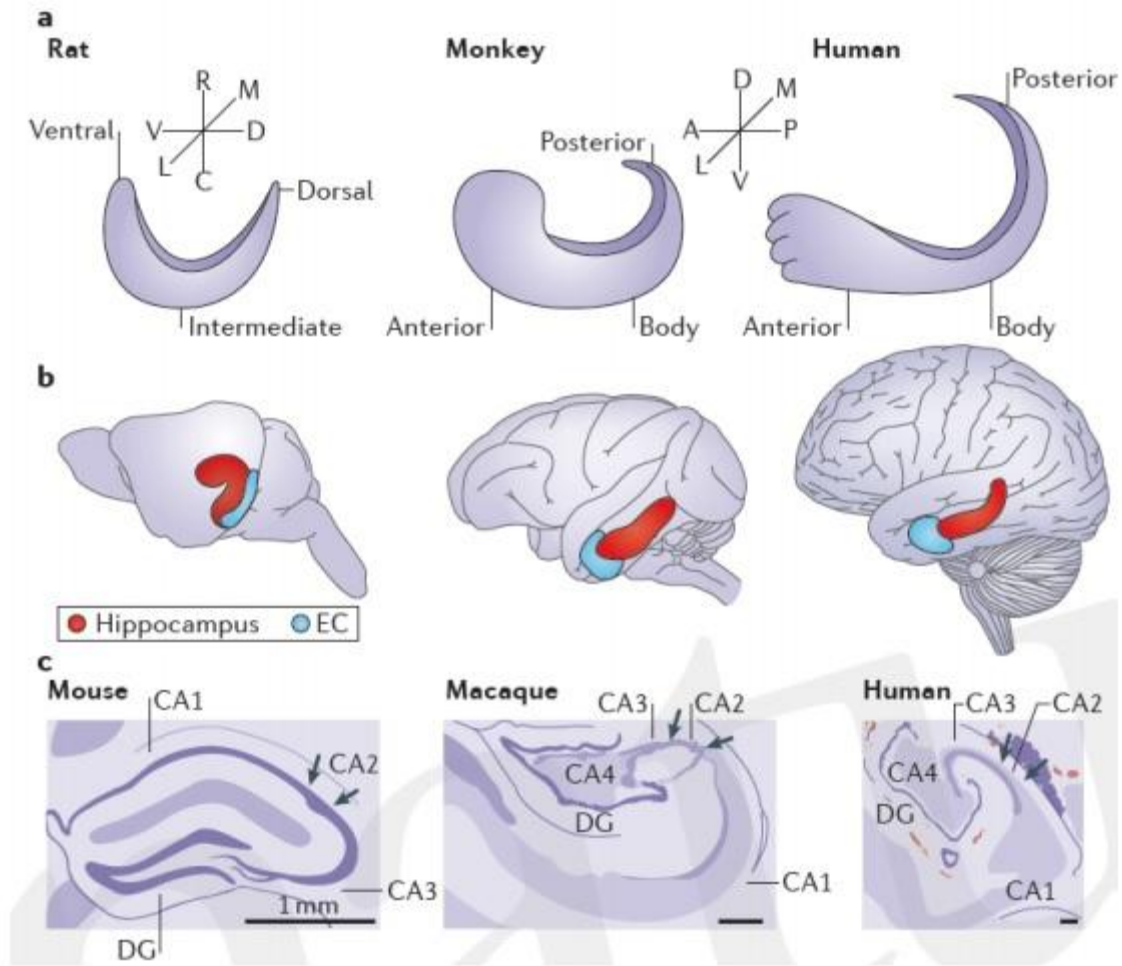
2012; Gannouni et al., 2013). Asimismo, se han reportado diversos efectos de la exposición al ruido en los individuos, tanto daños a la vía auditiva como alteraciones extra-auditivas, principalmente en el SNC, que incluyen cambios a nivel molecular, celular, fisiológico, conductual y cognitivo en humanos y animales de laboratorio (Manikandan et al., 2006; Rabat et al., 2006; Chioyenda et al., 2007; Cui et al., 2009; Tamura et al., 2012).

Considerando que la contaminación acústica se encuentra en aumento en las sociedades urbanizadas y que el SNC durante el desarrollo es susceptible a los estímulos del ambiente, resulta relevante el estudio de los posibles efectos del ruido en individuos en desarrollo y sus consecuencias a largo plazo mediante el uso de modelos animales, así como la implementación del enriquecimiento ambiental como una posible estrategia de neuroprotección no farmacológica.

## **2.2. El hipocampo**

### **2.2.1. Estructura y desarrollo**

El hipocampo (HC), estructura presente en diferentes especies de mamíferos, se encuentra en el lóbulo temporal de ambos hemisferios cerebrales, extendiéndose a lo largo del eje dorso-ventral en roedores, que corresponde al eje pósterio-anterior en humanos (Figuras 1a-b). Los mismos circuitos intrínsecos básicos se mantienen en todo el eje y en las distintas especies (figura 1c). Por otro lado, dado que las porciones dorsal y ventral del HC tienen diferentes conectividades con las áreas corticales y subcorticales, se ha planteado desde hace tiempo que el hipocampo no sería funcionalmente uniforme a lo largo de este eje (Strange et al., 2014).

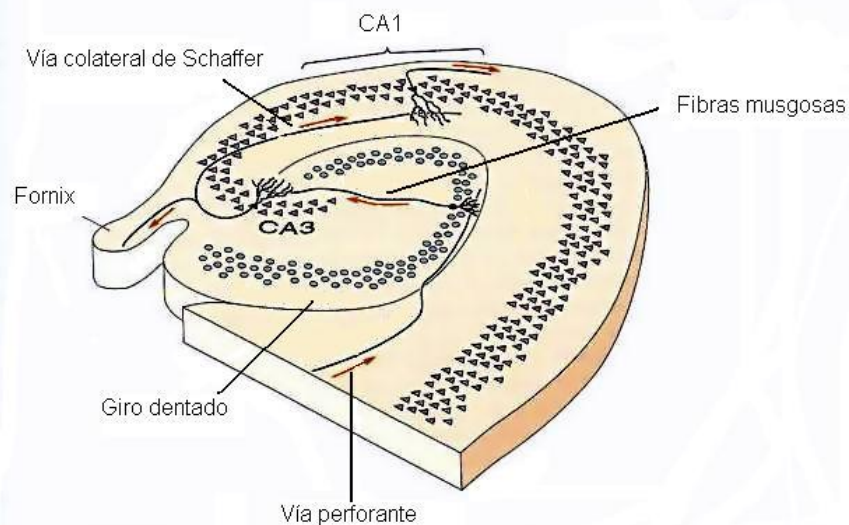


**Figura 1.** a) Ilustraciones esquemáticas de la orientación del eje del HC en la rata, el mono y el humano. b) El eje completo del HC (rojo) en cerebros semitransparentes de rata, mono y humano, con la corteza entorrinal en azul. c) Sección transversal de Nissl del HC en ratón, mono rhesus y humano. Barras de escala: 1mm. Imagen obtenida de Strange et al., 2014, Nat. Rev. Neurosci.

En el HC de la rata se pueden distinguir tres subregiones distintas (figura 1c): el giro dentado (GD), el hipocampo propiamente dicho (que consta de CA1, CA2 y CA3) y el subículo (van Strien et al., 2009). En esta estructura, diversos tipos de neuronas forman microcircuitos y cooperan para el procesamiento y almacenamiento de la información. Los tipos de células excitatorias glutamatérgicas dominantes en los microcircuitos del HC son las células piramidales (ubicadas en las regiones CA1 y CA3), las células granulares y las células musgosas (ubicadas en GD). Estas células forman redes que son las principales estructuras de procesamiento de información en el HC. Las células

excitatorias también están rodeadas por una variedad de interneuronas inhibitorias GABAérgicas.

Además, las neuronas del HC reciben y envían información a través de diferentes vías de la corteza y áreas extra-hipocampales. La mayor cantidad de conexiones del HC se establecen con la corteza entorrinal, que se localiza en la parte posterior y la conecta con otras áreas corticales. En segundo lugar, el HC tiene una gran cantidad de conexiones con el fornix, el cual lo conecta con profundas estructuras del cerebro (Swcatt, 2010). Las vías aferentes y eferentes más importantes en el HC incluyen: a) La vía perforante, que es la principal vía de ingreso al HC proveniente de la corteza entorrinal. Presenta axones que se conectan a CA1, CA3 y GD; b) La vía formada por los axones de las células granulares del giro dentado (fibras musgosas o *mossy fibers*), que hacen sinapsis con las neuronas piramidales de la región CA3; c) La vía colateral de Schaffer, que se origina en los axones de las neuronas piramidales CA3 y hacen sinapsis con neuronas del área CA1; d) Las fibras comisurales, que atraviesan la fimbria y hacen sinapsis con las neuronas piramidales de la región CA1 (Figura 2).



**Figura 2.** Principales vías aferentes y eferentes del HC. Imagen obtenida de Bear et al., 2002. 2º Ed.

El HC comienza su desarrollo, tanto en ratas como en humanos, durante el período fetal y continúa aún luego del nacimiento. Sin embargo, tiene diferentes

tiempos de maduración dependiendo de la especie que se trate. A partir de diferentes estudios, se han establecido los periodos de maduración del HC para cada especie y se han planteado correlaciones inter-específicas. De esta manera, si bien se trata de una estimación, en cuanto al desarrollo del HC se sugiere que la primera semana de vida de la rata (días 0-5) podría ser comparable al período gestacional del tercer trimestre de embarazo de los humanos. El primer año de la vida humana podría corresponder aproximadamente a los días 7-14 de vida postnatal (DPN) en la rata, con un máximo número de sinapsis al final de este período, que permanece alto hasta el segundo año humano y la 3ª semana de vida en la rata (Avishai-Eliner et al., 2002).

En la rata, la formación de las células piramidales ocurre en la segunda mitad del período de gestación, comenzando aproximadamente en el día gestacional (DG) 15 y culminando el DG 19 (dos días antes del nacimiento). En cambio, la formación de las células granulares comienza en el DG 18 y continúa su proliferación durante toda la vida (Rice & Barone, 2000).

Por otro lado, la diferenciación y sinaptogénesis de las células piramidales en la zona proximal y distal de la CA3 se logra al mes de vida postnatal, comenzando en el DPN 9 y logrando una maduración alrededor del DPN 21 (Avishai-Eliner et al., 2002). En cuanto a las células granulares del giro dentado, su primer periodo de neurogénesis se extiende por alrededor de 2-3 semanas, comenzando tardíamente en la embriogénesis. Si bien algunas células granulares surgen alrededor del DG 14, más del 80% lo hacen luego del nacimiento de la rata, alcanzando su pico máximo en la primera semana de vida postnatal. Más aún, hacia el DPN 1 las neuronas granulares más antiguas son visibles en la hoja supra-piramidal y exhiben dendritas rudimentarias que se extienden por la capa molecular. Las primeras neuronas de adulto se hacen presentes hacia el DPN 7, siendo algunas funcionales a esta edad. En consecuencia, estos datos sugieren que el giro dentado podría ser incorporado al circuito hipocampal recién al final de la primera semana postnatal. El árbol dendrítico de las células granulares, sin embargo, continúa aumentando en tamaño hasta el DPN 14. Luego de este

tiempo, el árbol dendrítico de las neuronas granulares más antiguas es esculpido y refinado (Rahimi y Claiborne, 2007).

En consecuencia, el HC inmaduro, que continúa desarrollándose aún luego del nacimiento, tanto en humanos como en roedores, podría ser vulnerable a la acción de diferentes estímulos capaces de interferir con sus procesos normales.

### 2.2.2. Funciones

A partir del famoso caso del paciente H.M., quien sufrió de amnesia desde que le extirparon el lóbulo temporal medial de ambos hemisferios cerebrales, una gran cantidad de investigaciones asociaron al HC con la memoria en humanos y otras especies (Scoville & Milner, 1957; Fanselow & Dong, 2010). Este caso fue muy importante, no solo porque se asoció al HC con la memoria semántica y la memoria episódica en humanos sino que, además, fue un ejemplo clínico de que existen diferentes tipos de memoria y diferentes procesos de la memoria, dado que en este paciente se presentaron diferentes disociaciones, estando algunos de estos procesos alterados y otros conservados (Corkin, 2002). Más aún, con el paso del tiempo se evaluaron otros casos de pacientes con lesiones en el lóbulo temporal medial, además de utilizarse modelos animales, para caracterizar las funciones del HC y de otras estructuras adyacentes.

Si bien ha existido debate acerca de los tipos de memoria que están relacionados al HC, hay evidencia de que la generación de lesiones en esta estructura conduce a alteraciones de la memoria episódica, la memoria de miedo contextual y la memoria espacial (Fanselow & Dong, 2010). Además, resulta importante aclarar que si bien el HC es fundamental para que se produzcan ciertos aprendizajes y memorias, también es necesaria la intervención de otras estructuras y áreas de la corteza, con las cuales trabajan en conjunto, para que se lleven a cabo estas funciones cognitivas (Izquierdo & Medina, 1997).

El aprendizaje puede ser definido como la adquisición de una nueva información, mientras que la memoria consistiría en la retención en el tiempo de la información adquirida durante el aprendizaje (Sweatt, 2010). Existen diferentes



tipos de aprendizajes que pueden ser no-asociativos (como la habituación y la sensibilización), asociativos (como el condicionamiento clásico y el condicionamiento operante) u otros tipos de aprendizaje complejos (como aprendizajes latentes, observacionales, abstractos, etc.). Para el estudio del aprendizaje y la memoria relacionados al HC en roedores, se han desarrollado diferentes pruebas conductuales que permiten detectar posibles alteraciones en estas funciones cognitivas.

En particular, hay diferentes pruebas que se utilizan para evaluar la memoria contextual de miedo, es decir, la asociación entre un contexto y un estímulo aversivo que le produce miedo al animal. Diferentes estudios han mostrado que lesiones o manipulaciones genéticas o farmacológicas del HC pueden generar déficits en este tipo de tareas, pero no en otras pruebas de memoria asociativa de miedo, donde el estímulo condicionado no es un contexto (como por ejemplo, un tono o una luz). Esta selectividad al contexto sugiere que el déficit en las pruebas de condicionamiento de miedo contextual a causa de daños en el HC ocurriría como consecuencia de una falla en el procesamiento del contexto y no de un déficit emocional (Fanselow & Dong, 2010). Asimismo, para que se produzca este tipo de aprendizaje es necesario un periodo de exploración durante el cual se hipotetiza que las características del contexto se integran en una representación coherente del mismo (Fanselow, 2000). Más aún, se ha reportado que la utilización de antagonistas de los receptores NMDA e inhibidores de la síntesis de proteínas directamente en el HC, bloquean las memorias de miedo contextuales si se administran previamente a la exploración del contexto (Barrientos et al., 2002; Stote & Fanselow, 2004).

Por otra parte, el HC tendría un rol fundamental en el procesamiento de la información espacial. Las señales espaciales generalmente se consideran representaciones complejas y multimodales del entorno, que comprenden información de diferentes modalidades sensoriales (Bannerman et al., 2014). Para evaluar este tipo de memoria también se han desarrollado diferentes pruebas conductuales. Algunas de estas tareas espaciales pueden resolverse sobre la base de información "egocéntrica" (por ejemplo, utilizando claves vestibulares o

propioceptivas), mientras que otras pruebas espaciales requieren la codificación de la relación entre las características más destacadas del entorno para crear una representación "alocéntrica" que es independiente de la ubicación real del animal (O'Keefe y Nadel, 1971, 1978). Varios estudios han investigado los efectos de lesiones del HC en el desempeño de los animales en tareas de memoria espacial y se han encontrado alteraciones de la memoria espacial alocéntrica, pero no de la egocéntrica en una amplia variedad de tareas (Morris et al., 1982, 1990; Rawlins & Olton, 1982; Eichenbaum et al., 1990; Schmitt et al., 2003). De hecho, el hipocampo juega un papel importante en el procesamiento de la información espacial alocéntrica en una gran cantidad de especies, incluidos los humanos (Maguire et al., 1998, 1999; Burgess et al., 2002). Más aún, estudios anatómicos y comportamentales permitieron identificar que sería la zona dorsal del HC la que estaría implicada en la memoria espacial (Moser & Moser, 1993; Bannerman et al., 1999, 2002; Fanselow & Dong, 2010). Estos hallazgos son coherentes con el hecho de que esta zona es la que recibe la mayor parte de la información visuo-espacial de las modalidades sensoriales (Moser & Moser, 1998). Por último, también se ha postulado que las funciones nemotécnicas del HC no estarían restringidas al dominio espacial (Agster et al., 2002; Fortin et al., 2002; Kesner et al., 2002; Eichenbaum & Fortin, 2003; Morris et al., 2003).

Por otro lado, se ha planteado que el HC ventral, pero no el HC dorsal, tendría un rol en la mediación del comportamiento defensivo no condicionado (Kjelstrup et al., 2002; McHugh et al., 2004; Pentkowski et al., 2006). Kjelstrup et al. (2002) practicaron lesiones en la zona ventral y/o dorsal del HC de ratas y las evaluaron con diferentes pruebas conductuales. En esta investigación, encontraron que las ratas con lesiones en el HC ventral tenían una disminución significativa de los comportamientos defensivos no condicionados, ya que no evitaban la zona potencialmente peligrosa del laberinto en cruz elevado. Más aún, estos animales no presentaban déficits en las pruebas de condicionamiento de miedo contextual ni en la navegación espacial. Por otro lado, animales que tenían lesiones selectivas en la amígdala no redujeron las respuestas defensivas, lo cual sugiere que el HC ventral podría influir en la expresión del miedo no condicionado

independientemente de la amígdala, concretamente a través de proyecciones directas desde el HC ventral a los sistemas neuroendocrinos y de control del comportamiento en el hipotálamo (Risold & Swanson, 1996; Kjelstrup et al., 2002; Strange et al., 2014). Finalmente, Pentkowski et al. (2006), plantearon que el HC ventral modularía el comportamiento defensivo relacionado con la ansiedad (ante una amenaza anticipada o potencial), en lugar del miedo (ante una amenaza inmediata y clara), que dependería del núcleo amigdalino.

Dada la implicancia del HC en estas funciones cognitivas, la implementación de diversos tests que permitan su evaluación es crucial para poder estudiar cómo diferentes injurias ambientales son capaces de interferir con las mismas.

### **2.3. La exposición al ruido y sus efectos**

La contaminación acústica es producida por la presencia de un agente físico llamado “ruido”. Es generada por emisores acústicos diversos e implica molestias y daños potenciales tanto para los individuos como para el desarrollo de sus actividades, provocando también efectos significativos sobre el medio ambiente. El ruido puede ser definido como un sonido no placentero, generalmente de moderada a alta intensidad (Kanjó, 2009). Se encuentra formado por un amplio rango de frecuencias, difiriendo de los sonidos naturales y la música (Gourévitch et al., 2014). Por lo tanto la exposición al ruido, en intensidades moderadas o elevadas, constituye un agente potencial de daño para el organismo y es en la actualidad uno de los principales problemas medioambientales que afecta a la mayoría de los centros urbanos.

Según el Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional de los Estados Unidos de América (NIOSH, 1998), así como de acuerdo a diferentes estudios (Fogari et al., 1994; Lutman, 2000), el ruido resultaría inofensivo si se produce con una intensidad menor de 80 decibeles (dB). Sin embargo, las personas diariamente se encuentran expuestas a niveles de ruido superiores,

potencialmente peligrosos, relacionados con el ambiente laboral, el tráfico urbano, los electrodomésticos, las discotecas, etc. (Berglund, et al. 1999; Frenzilli et al., 2004; Konings et al., 2009; Lee et al., 2012; Lee et al., 2014).

En la literatura se describen diferentes estudios acerca de la relación entre niveles elevados de ruido y trauma auditivo en animales (Rabat et al., 2006, Kaltenbach, 2000; Kaltenbach and Zhang, 2007; Kujawa and Liberman, 2009). Sin embargo, existen escasos reportes en cuanto a los efectos extra-auditivos del ruido sobre los distintos tejidos, como el SNC (Manikandan et al., 2005, 2006) o el sistema inmune (Zheng y Ariizumi, 2007). Si bien habitualmente los cambios inducidos por el ruido suelen presentarse de forma transitoria, muchas veces pueden llegar a perdurar o incluso generar cambios permanentes (Manikandan et al., 2006; Cui et al., 2009; Kujawa & Liberman, 2009; Uran et al., 2014; Liu et al., 2016). En particular, la exposición aguda al ruido puede activar los sistemas autónomo y endócrino, así como conducir a un aumento de la presión arterial y del ritmo cardíaco o generar trastornos del sueño (Gitanjali y Ananth, 2003). En cambio, la exposición crónica puede causar efectos permanentes, como un déficit mnésico, enfermedad coronaria o hipertensión (Turner et al., 2005; de Souza et al., 2015). El ruido crónico a intensidades elevadas es capaz de generar una variedad de síntomas, incluyendo ansiedad, estrés, trastornos del sueño y de la alimentación, así como un aumento en conflictos sociales y trastornos psiquiátricos (Rabat, 2007). El ruido ambiental también puede ser causante de disfunciones cognitivas, particularmente en la función ejecutiva y la memoria episódica. Estudios realizados en poblaciones humanas sanas mostraron que tanto el ruido urbano como el social pueden enlentecer la velocidad psicomotora, la memoria episódica y la de trabajo. Más aún, la toma de decisiones puede tornarse más cautelosa bajo condiciones de ruido (Wright et al., 2016).

Resulta importante destacar que varias investigaciones surgieron a partir de la creciente preocupación acerca del ambiente ruidoso experimentado en las unidades de cuidado intensivo neonatales (UCIN) en distintos países. Si bien el nivel recomendado de ruido ambiente para las UCIN es de 45-55 dB (AAP, 1997), se han reportado intensidades superiores a estos valores en diferentes

centros, que varían desde 55 a 67 dB con picos de 75 a 120 dB (Kent et al., 2002; Levy, 2003; Darcy et al., 2008; Zimmerman & Lahav, 2012). Varios estudios han reportado que la exposición a estas intensidades elevadas de ruido podría causar una variedad de alteraciones fisiológicas, auditivas y en el SNC de los neonatos, tanto a corto como largo plazo (Abramovich et al., 1979; Wachman & Lahav, 2010; Bures et al., 2016).

Las características del ruido (intensidad, frecuencias, etc.) y de la exposición (tiempo de exposición, número de exposiciones, intervalos de tiempo entre una exposición y otra, etc.), así como la edad de exposición (infancia, adolescencia, adultez) puede influir de distintos modos sobre los resultados a obtener. Por tal motivo, el uso de un modelo animal que tenga en cuenta dichas variables, como el utilizado en el presente proyecto, permitiría una comparación minuciosa de las distintas condiciones en juego.

#### 2.3.1. Efectos de la exposición al ruido sobre el sistema auditivo

La mayor parte de las investigaciones sobre el ruido se han enfocado en los daños producidos sobre el sistema auditivo, principalmente cuando el ruido está presente a intensidades elevadas (Pouyatos et al., 2005; Fetoni et al., 2013). De hecho, el ruido ambiental se encuentra entre los agentes que con mayor frecuencia causan pérdida auditiva (Henderson et al., 2006). Aunque se sabe que el ruido ambiental puede causar estos daños, las consecuencias del impacto del ruido son subestimadas en gran medida por los referentes de la salud pública a nivel global y poco se investigó acerca de las posibles estrategias disponibles dirigidas a contrarrestar el daño inducido por dicho agente (Le Prell et al., 2007; Pourova et al., 2010; Alvarado et al., 2015; Fetoni et al., 2015). Si bien se estima que el ruido ocupacional causa pérdida auditiva incapacitante en una proporción del 16% de los adultos en todo el mundo, hay pocos datos disponibles sobre los efectos de la exposición al ruido de las personas en su vida diaria (Passchier-Vermeer & Passchier, 2000; Kopke et al., 2007). Por lo tanto, aunque la exposición al ruido es un gran problema en ciertas ocupaciones, la población en general también podría estar en riesgo.

Varios estudios realizados en roedores han mostrado que la exposición al ruido puede generar lesiones en las estructuras auditivas periféricas, principalmente dañando las células ciliares y las células de soporte de la cóclea, así como también las células del ganglio espiral del nervio auditivo (Saunders et al., 1985; Henderson et al., 2006; Ohlemiller, 2008). Según Gourévitch et al. (2014), la exposición a sonidos de altas intensidades (105 dB o superiores) por, al menos, una hora, es capaz de producir daño estructural a las células ciliares de la cóclea, lo cual resulta en una disminución en la sensibilidad auditiva y en un aumento del umbral auditivo. Dado que las células ciliares no se regeneran, estos daños estructurales podrían conducir a una pérdida auditiva permanente, así como también provocar modificaciones en la actividad de las fibras nerviosas y finalmente en la representación tonotópica de la corteza (Syka, 2002; Pienkowski y Eggermont, 2009, 2010; Wang et al., 2011; Mannström et al., 2015; Sanz et al., 2015).

Por otra parte, la exposición a intensidades moderadas de ruido (80 a 105 dB) durante algunas horas, situación que suele observarse en personas que asisten a conciertos, discotecas, entornos laborales ruidosos o como consecuencia del uso de dispositivos personales de audio, puede generar pérdida auditiva temporal durante algunos minutos o días (Gourévitch et al., 2014). Debido a que los umbrales auditivos parecen volver a la normalidad luego de un tiempo, siempre que el individuo no se vuelva a exponer, ha habido poca preocupación respecto a los posibles daños que podría causar la exposición a estas intensidades de ruido. Sin embargo, algunos estudios realizados con animales de experimentación han encontrado alteraciones que persisten en el tiempo a pesar de que se encuentren valores normales en el audiograma (Kujawa & Liberman, 2009; Mannström et al., 2015; Pienkowski and Eggermont, 2009, 2010). Por ejemplo, se ha encontrado que la exposición a ruido moderado puede provocar cambios persistentes en la función cortical auditiva sin que haya alteraciones en la estructura y la funcionalidad de la cóclea y el tronco encefálico inferior (Pienkowski and Eggermont, 2012). Por su parte, Kujawa y Liberman (2006, 2009) hallaron que si bien la exposición a intensidades moderadas de ruido puede generar un

aumento en el umbral auditivo de forma transitoria dejando las células cocleares intactas, provocaría una pérdida de terminaciones nerviosas aferentes y una degeneración retardada del nervio coclear. Teniendo en cuenta estos resultados, estos autores plantearon que el daño inducido por el ruido moderado en el oído tendría consecuencias progresivas que estarían considerablemente más extendidas de lo que revelan las pruebas de umbral convencionales.

Por otro lado, también se han estudiado los efectos de la exposición al ruido en el sistema auditivo de roedores expuestos a la injuria durante el desarrollo. El sistema auditivo de las ratas se vuelve sensible a los sonidos del ambiente entre los días 10 y 12 postnatales (Bures et al., 2010) y a partir de ese momento se considera que comienza un periodo crítico (PC) de plasticidad neuronal durante el cual el sistema auditivo se refina y desarrolla hacia el estado maduro. Durante este periodo, la exposición a estímulos auditivos del ambiente influencia profundamente el desarrollo del sistema auditivo y las conexiones neuronales. En este sentido, la exposición al ruido durante este PC podría tener fuertes influencias en la estructura y funcionalidad del sistema auditivo que podrían perdurar en el tiempo. En consecuencia, diversos estudios evaluaron los efectos a largo plazo de la exposición temprana al ruido durante este PC, encontrando alteraciones en diferentes niveles del sistema auditivo de animales maduros, incluyendo: una disminución en el número de células ciliares y sus sinapsis (Pierson & Daqing, 1996; Rybalko et al., 2015; Shi et al., 2015), anormalidades en las arborizaciones dendríticas y el tamaño del cuerpo neuronal de neuronas de la corteza auditiva (Ouda et al., 2014; Bures et al., 2016), cambios en la eficacia sináptica tálamo-cortical (Speechley et al., 2007), modificaciones en la respuesta y la representación cortical de los estímulos auditivos (Zhang et al., 2001; Chang & Merzenich, 2003; Grécová et al., 2009; Bures et al., 2010; Insanally et al., 2010) o cambios en funciones fisiológicas y en la respuesta comportamental a estímulos sonoros (Sun et al., 2011; Rybalco et al., 2011, 2015; Suta et al., 2015). Resulta interesante que en algunas de estas investigaciones se expusieron animales adultos a los mismos estímulos auditivos que los animales en desarrollo y se encontraron diferentes resultados. Por

ejemplo, Zhang et al. (2002) expusieron ratas a pulsos de ruido blanco a una intensidad moderada desde el DPN 9 hasta el DPN 28 y encontraron diferentes respuestas cuando se compararon con animales adultos. Por otro lado, Freeman et al. (1999) expusieron ratas en desarrollo y ratas adultas a 102 dB de ruido blanco durante 15 días, encontrando alteraciones auditivas estructurales y funcionales que variaron según la edad de exposición al mismo estímulo: los animales expuestos durante el desarrollo presentaron mayor daño en las células ciliares en edad adulta en comparación con los animales expuestos durante la adultez, aunque mostraron menor daño en la función auditiva. En consecuencia, teniendo en cuenta estos estudios y el concepto de PC, tanto las características del estímulo ambiental (intensidad, duración, etc.) como la edad en la cual los animales son expuestos resultan relevantes, dada la susceptibilidad del sistema nervioso ante dichos estímulos, pudiendo esto determinar los cambios a producirse y la duración de los mismos.

Estudios previos realizados en este laboratorio (Uran et al., 2014) mostraron que la exposición de ratas Wistar de 15 DPN a 95-97 dB de ruido blanco durante dos horas, genera un aumento de la respuesta auditiva del tallo cerebral (ABR) en todas las frecuencias analizadas (aumento de los umbrales auditivos) así como en el producto de distorsión de emisiones acústicas (DPOAEs), indicadores de daño neuronal y de las células ciliares externas, que fue mayor en los animales expuestos durante 15 días seguidos cuando se compararon con los animales controles. Al investigar estos mismos parámetros a mayor plazo, se encontró una reversión de las alteraciones de la ABR y el DPOAE, apoyando resultados de otros autores (Kujawa y Liberman, 2006, 2009). En este sentido, Furman et al. (2013) postularon que la recuperación de los umbrales auditivos podría deberse a que el daño sería selectivo para un subconjunto de fibras nerviosas de umbral alto. Estas fibras serían importantes para la audición normal en medios ruidosos dada su resistencia al enmascaramiento que produce el ruido de fondo sobre otros sonidos.



### 2.3.2. Efectos extra-auditivos de la exposición al ruido

#### 2.3.2.1. Efectos del ruido en individuos adultos

Los efectos del ruido sobre regiones extra-auditivas no han sido tan estudiados como los auditivos. Sin embargo, se han reportado cambios en diferentes tejidos, siendo particularmente relevantes los cambios producidos a nivel del SNC. Tamura et al. (2012) sugirieron que el ruido sería capaz de inducir sus efectos en los organismos vivos tanto de forma directa (a través de la vía auditiva o la vibración mecánica de los tejidos) como indirecta (a través de vías no convencionales). El hipocampo, por ejemplo, es capaz de responder a estímulos auditivos por una vía no convencional (Xi et al., 1994; Sakurai, 2002). Por tal motivo, esta región podría ser afectada indirectamente por el ruido (Kraus et al., 2010), demostrando la eficiencia de la transmisión del impacto del ruido al cerebro. Otros estudios también exploraron los efectos de la exposición al ruido, encontrando cambios a nivel extra-auditivo (Trapanotto et al., 2004; Manikandan et al., 2006; Fonseca et al., 2012).

En humanos, la exposición diaria al ruido ocupacional es capaz de causar molestias, fatiga física y mental, irritabilidad y angustia (Sundstrom et al., 1994; Olaosun et al., 2009; Yoon et al., 2014), lo cual puede afectar a la satisfacción y el desempeño laboral. Según Livi et al. (2018) estos efectos negativos en los trabajadores varían de acuerdo a la sensibilidad individual a la exposición. Asimismo, también se ha asociado el ruido ocupacional con alteraciones cardiovasculares y autonómicas, como un aumento de la frecuencia cardíaca y una mayor prevalencia de hipertensión en los trabajadores, así como también con un aumento de los tiempos de reacción ante determinados estímulos (Saha et al., 1996; de Souza et al., 2015). Por último, se han reportado efectos del ruido ocupacional sobre el SNC. Por ejemplo, Chiovenda et al. (2007) compararon trabajadores que fueron expuestos 8 horas diarias a alrededor de 92 dB con otros expuestos diariamente a 54 dB y encontraron una mayor sensibilidad cerebral al estrés en aquellos expuestos a niveles más elevados de ruido, sugiriendo que la intensidad del ruido puede afectar de manera diferencial el SNC.

Por otra parte, algunos estudios han mostrado que vivir en un ambiente ruidoso puede afectar la fisiología y el comportamiento de las personas, así como el patrón de sueño, el rendimiento laboral y la comunicación entre iguales (Abel, 1990; Tamura et al., 2012). Seidman et al. (2010) sugirieron que la exposición al ruido puede afectar la homeostasis cardiovascular y autonómica, lo que conduciría a una reducción en la calidad de vida, probablemente a través de la liberación de hormonas del estrés como las catecolaminas y los corticosteroides. Más aún, Munzely et al. (2014) reportaron que las repetidas excitaciones autonómicas en las personas expuestas al ruido durante períodos prolongados podrían inducir un aumento de la presión arterial y aumentar el riesgo de desarrollar hipertensión.

Diferentes investigaciones realizadas en animales de experimentación exploraron los efectos del ruido moderado, enfocándose en modificaciones del comportamiento, así como en diferentes estructuras del SNC, buscando además una correlación entre dichos parámetros. Roedores adultos expuestos a intensidades moderadas de ruido (80-105 dB) mostraron déficits en el aprendizaje y la memoria en diferentes tareas de memoria espacial, memoria asociativa y de reconocimiento de objetos (Rabat et al., 2006; Cui et al., 2009; Cheng et al., 2011; Mandikandam et al., 2013; Azman et al., 2015; Wang et al., 2016). Además, se han reportado cambios en la actividad exploratoria (Pan et al., 2006; Cheng et al., 2011), en comportamientos relacionados a la ansiedad y de tipo depresivo (Angrini & Leslie, 2012; Naqvi et al., 2012; Azman et al., 2015; Eroslan et al., 2015). Por otra parte, también se investigó la influencia de la exposición al ruido moderado en estructuras del SNC, principalmente en el HC y la corteza prefrontal (CPF). En estas estructuras se halló un aumento del estrés oxidativo, una disminución de las proteínas sinápticas, así como un aumento en el daño y la muerte neuronal (Mandikandan et al., 2006, 2013; Cheng et al., 2011, 2016; Wang et al., 2016). Asimismo, también se ha reportado una disminución de la neurogénesis y modificaciones en la neurotransmisión glutamatérgica y GABAérgica del HC (Cui et al., 2009; Kraus et al., 2010). En estos estudios, el periodo de exposición al ruido varió principalmente entre 1 a 4 semanas (exposición sub-aguda o crónica),

pero en algunos casos, se encontraron cambios significativos con tan solo 1 o 2 días de exposición al estresor (exposición aguda).

Además, se han observado correlaciones entre los parámetros comportamentales alterados y los cambios hallados en el HC y la CPF. Por ejemplo, Wang et al. (2016) encontraron déficits en la memoria espacial y la memoria asociativa, así como una disminución en la actividad exploratoria y el interés por la novedad en ratones expuestos a ruido moderado durante 6 semanas. A su vez, estos cambios en el comportamiento fueron correlacionados con un aumento en la peroxidación de lípidos y una disminución de la actividad de antioxidantes endógenos en el HC y la CPF, indicadores de estrés oxidativo. Los autores plantearon que los cambios encontrados en el HC y la CPF serían los responsables de las alteraciones en el comportamiento. Por su parte, Cui et al. (2009) encontraron que la exposición a ruido moderado, 4 horas diarias durante 30 días, generó un aumento de la concentración de glutamato y una disminución de los niveles de GABA en el HC, lo cual podría haber conducido a las alteraciones de la plasticidad sináptica y el déficit en el aprendizaje y la memoria espacial que encontraron. Finalmente, Manikandan et al. (2006), utilizando un modelo de exposición similar, encontraron un déficit en la memoria espacial y lo correlacionaron con la presencia de estrés oxidativo y una disminución en el recuento dendrítico en HC y CPF. En resumen, se ha encontrado evidencia de diferentes parámetros alterados en el HC y la CPF que podrían explicar los cambios que se observaron en el comportamiento de los animales expuestos al ruido moderado.

#### 2.3.2.2. Efectos del ruido en individuos en desarrollo

Algunos autores han investigado los efectos del ruido en individuos en desarrollo, tanto en humanos como en otras especies, periodo durante el cual se considera que habría una mayor vulnerabilidad a los efectos de estresores como el ruido (Wang et al., 2004). Según Van Kamp y Davies (2013), a partir del análisis de varios estudios comparativos, los niños serían menos vulnerables que los adultos a las molestias que ocasiona el ruido pero más sensibles a los efectos

cognitivos. Las investigaciones realizadas sobre los efectos del ruido en niños comparan poblaciones que habitualmente se exponen a altas intensidades con otras que se encuentran en lugares donde se registran intensidades más bajas. Algunos estudios asociaron el ruido del tráfico aéreo de zonas cercanas a aeropuertos, del tráfico urbano o del ferrocarril, con efectos cognitivos que incluyen alteraciones en la comprensión lectora, la memoria y dificultades para concentrarse (Evans et al., 2001; Stansfeld et al., 2005, 2015; Clark et al., 2012; Van Kempen et al., 2012). También se ha reportado que el ruido podría provocar una disminución del bienestar y un aumento del estrés (Ising et al., 2004; Stansfeld & Clark, 2015). Por otra parte, si bien la exposición al ruido no se ha asociado con serias alteraciones de la salud mental de los niños, algunos estudios mostraron una correlación con problemas de la conducta e hiperactividad (Tiesler et al., 2013; Dreger et al., 2015; Standfeld et al., 2015; Hjortebjerg et al., 2016). Finalmente, se han hallado alteraciones de la presión sanguínea (Paunović et al., 2011; Bilenko et al., 2013; Liu et al., 2013) y trastornos del sueño (Ohrstrom et al., 2006; Pirrera et al., 2010).

Pocos trabajos investigaron los efectos del ruido en niños de forma prospectiva hallando cambios antes o después de la exposición al ruido. Uno de estos trabajos es un estudio realizado en las cercanías del Aeropuerto de Munich (Hygge et al., 2002), el cual fue reubicado en otra parte de la ciudad. En este estudio se evaluó el desempeño cognitivo de niños de entre 8 y 12 años, comparando el rendimiento de individuos que se encontraban en zonas cercanas al aeropuerto (grupo expuesto al ruido) con otros que se encontraban en áreas donde había poca exposición al tráfico aéreo. Antes del cierre del viejo aeropuerto, los niños que vivían en zonas cercanas mostraron déficits en la memoria a largo plazo y la comprensión lectora. Uno de los resultados más interesantes de este estudio es que se realizó una nueva evaluación dos años después de que el aeropuerto cerró y estos déficits habían desaparecido, mostrando que se trataría de alteraciones reversibles con el tiempo luego de que la exposición al ruido cesó. Por otra parte, niños que vivían en áreas cercanas al nuevo aeropuerto comenzaron a tener déficits en la memoria a largo plazo y la comprensión lectora

dos años después de su apertura. Los resultados de este trabajo longitudinal aportan evidencia importante sobre la relación causa-efecto entre la exposición al ruido y los déficits cognitivos.

Pocos grupos de los que investigan los efectos extra-auditivos del ruido lo hacen utilizando como modelo animales en desarrollo. Un grupo de investigación perteneciente a la Universidad de Guadalajara (México) diseñó experimentos en los que se expusieron ratas a ruido sub-agudo desde el DPN 21 al 35, en las cuales se evaluaron diferentes parámetros conductuales y de regiones del cerebro asociadas con los comportamientos estudiados. Los animales fueron expuestos 24 horas diarias (Jauregui-Huerta et al., 2010, 2011) o durante la fase oscura (Ruvalcaba-Delgadillo et al., 2015; Huet-Bello et al., 2017) a un ambiente ruidoso que consistió en audios urbanos con eventos ruidosos impredecibles (85-103 dB) separados por intervalos de silencio. Ruvalcaba et al. (2015) evaluaron la memoria de trabajo de las ratas expuestas con la prueba del laberinto en T y analizaron mediante técnicas histoquímicas posibles cambios en la estructura de la CPF, la cual se ha asociado con esta función cognitiva. Los autores encontraron que los animales expuestos tuvieron un peor desempeño en la tarea que los animales controles, cuando se evaluó a los 90 días postnatales. Además, en la evaluación histoquímica estas ratas presentaron un menor número de astrocitos y de células proliferativas en la CPF. Teniendo en cuenta estos resultados, la exposición temprana al ruido ambiental podría tener consecuencias duraderas en el tiempo, tanto en la morfología de la CPF como en los procesos cognitivos de la memoria de trabajo relacionados con esta estructura. En otros estudios, estos autores investigaron los efectos del ruido sobre el HC y comportamientos relacionados a esta estructura. Jauregui-Huerta et al. (2010) evaluaron el desempeño de las ratas expuestas en el laberinto acuático de ocho brazos posteriormente a la exposición (a partir del DPN 36, juveniles) y a largo término (a partir del DPN 90, adultos). Si bien no se encontraron diferencias durante el entrenamiento, cuando se modificó la ubicación de la plataforma escondida (aprendizaje de reversión), los animales juveniles expuestos al ruido tuvieron una mayor latencia para encontrar la plataforma y un aumento en el número de errores de la memoria de referencia y

de la memoria de trabajo espacial con respecto a sus controles. Cuando se evaluaron las ratas adultas, también se encontró un déficit en el aprendizaje de reversión que fue mayor para los animales que se estresaron por segunda vez. Por otra parte, Jauregui-Huerta et al. (2011) encontraron que los animales tratados con este protocolo presentaban una disminución de la proliferación celular en las regiones GD y CA3 del HC a los 90 días de edad. Teniendo en cuenta ambos trabajos, podría concluirse que el ruido podría inducir alteraciones que perduran en el tiempo, por un lado generando una disminución en la capacidad proliferativa de las células del HC y un déficit en la flexibilidad necesaria para aprender una nueva configuración espacial y, por el otro, modulando la capacidad de la rata para enfrentar el estrés más adelante en la vida.

Finalmente, en nuestro laboratorio se estudiaron los efectos extra-auditivos de la exposición temprana al ruido a distintos tiempos post-exposición (Uran et al., 2010, 2012, 2014). El protocolo llevado a cabo incluyó la exposición al ruido de ratas Wistar a 15 DPN, edad en la cual los animales ya poseen una vía auditiva desarrollada. Los animales fueron expuestos una única vez (exposición aguda) o durante 15 días consecutivos (exposición sub-aguda), 2 horas a ruido blanco, a una intensidad de 95-97 dB. Se realizaron diferentes evaluaciones conductuales, bioquímicas e histológicas a diferentes tiempos post-exposición. Los comportamientos evaluados incluyeron diferentes tipos de memoria y parámetros relacionados a la ansiedad, los cuales se han asociado a la funcionalidad del HC, mientras que las técnicas bioquímicas e histológicas se realizaron para evaluar posibles alteraciones en dicha estructura, las cuales podrían subyacer a los cambios en el comportamiento. Resulta interesante resaltar que al igual que ocurrió con las alteraciones de la función auditiva, los cambios en el comportamiento observados a los 30 días fueron mayores para las ratas expuestas a ruido sub-agudo y se revirtieron en los animales de 90 días, tratándose también de alteraciones transitorias. Teniendo en cuenta estas correlaciones, se podría sugerir que el daño en el HC podría estar mediado, al menos en parte, por el daño en la vía auditiva. Las alteraciones en el comportamiento podrían deberse a un ingreso anormal de señales auditivas al

cerebro, ya sea por la hiperactividad que se produjo durante la exposición al ruido o a causa de la pérdida auditiva transitoria observada en este grupo. El hallazgo de una disminución en los niveles de ROS y aumento de la actividad de catalasa en el HC de animales expuestos, en especial aquellos expuestos por 15 días, sugiere que el ruido sería capaz de gatillar un desbalance oxidativo, tanto a corto como a largo término, con el objeto de contrarrestar o evitar un mayor daño (Uran et al., 2014). Además, en este trabajo se encontraron alteraciones histológicas en el HC de animales de 30 DPN, que incluyeron un aumento del número de células en la capa CA1 y de las células picnóticas. Los autores concluyeron que un desbalance oxidativo podría haber causado las alteraciones histológicas, las cuales provocarían los cambios en el comportamiento.

De todas formas, si bien en estos trabajos se encontraron alteraciones en comportamientos relacionados al HC y en distintos parámetros moleculares y celulares de esta estructura, no se debería descartar que el ruido podría haber dañado también otras estructuras implicadas en este tipo de comportamientos, como por ejemplo, el núcleo amigdalino y la CPF (Mandikandan et al., 2006; Eraslan et al., 2015; Ruvalcaba et al., 2015; Wang et al., 2016).

Finalmente, tampoco habría que descartar que las alteraciones observadas en el comportamiento pudieran deberse, al menos en parte, al daño en la vía auditiva. En este sentido, Liu et al. (2016) plantearon que los efectos del ruido sobre las habilidades cognitivas podrían producirse a través de la pérdida auditiva y no a causa del estrés oxidativo. En este estudio, investigaron los efectos de una única exposición al ruido (123 dB) durante dos horas en ratones adultos. Los animales expuestos mostraron un aumento de corticosterona en plasma y de los niveles de SOD y malondialdehído en el HC, indicadores de estrés oxidativo, solamente el día de la exposición y no en los días posteriores, tratándose de un aumento transitorio. Por otro lado, estos animales presentaron un aumento de los umbrales auditivos, así como un déficit en la memoria espacial y en la neurogénesis del HC 3 meses luego de la exposición. Considerando estos resultados, plantearon que dado el carácter transitorio de los cambios en los parámetros evaluados, el estrés oxidativo no parecería ser el

responsable de estas alteraciones a largo plazo y que la pérdida auditiva podría explicarlos.

En resumen, la exposición al ruido sería capaz de generar diferentes alteraciones tanto en el sistema auditivo, afectando su anatomía y funcionalidad, como en estructuras extra-auditivas, produciendo cambios en distintos niveles de organización afectando parámetros moleculares, celulares y comportamentales. En el sistema auditivo se han hallado modificaciones capaces de afectar a distintos componentes de forma transitoria o permanente, dependiendo de la intensidad del estímulo, el tiempo de exposición y la edad de los individuos. Por otro lado, se han encontrado cambios en el comportamiento de los animales expuestos y se han correlacionado con diferentes parámetros alterados en estructuras del SNC. En particular, el HC parecería ser una estructura vulnerable a los efectos del ruido ya que se han encontrado alteraciones en sus regiones y en comportamientos relacionados al mismo. Finalmente, si bien aún no se conocen los mecanismos mediante los cuales el ruido generaría estas alteraciones, algunos autores han planteado que podría hacerlo a través de la activación de la vía auditiva, posiblemente a partir de la generación de un desbalance oxidativo. Sin embargo, dado que todos los estudios se realizaron en roedores con una vía auditiva desarrollada, no se ha podido descartar que el ruido esté generando los efectos extra-auditivos a través de su acción en otras vías, como por ejemplo, a través de la vibración inducida en los tejidos.

## **2.4. El estrés oxidativo como un posible mecanismo mediante el cual la exposición al ruido podría causar daño celular**

### **2.4.1. ¿Qué es el estrés oxidativo?**

Diferentes estímulos del ambiente pueden aumentar la producción de las especies reactivas al oxígeno (ROS) en diferentes tejidos, lo cual puede conducir a la activación de las defensas antioxidantes endógenas como mecanismo compensatorio que permite mantener el equilibrio entre los oxidantes y los



antioxidantes (Siti et al., 2015). En determinadas condiciones patológicas, el aumento excesivo de ROS puede superar a las defensas antioxidantes de las células produciendo un desbalance oxidativo a favor de los oxidantes, denominado estrés oxidativo, que se ha asociado con la disfunción y muerte celular (Sathyasaikumar et al., 2007; Caceres et al., 2009; Bendix et al., 2012; Sies et al., 2015).

Las ROS incluyen tanto radicales de oxígeno como agentes oxidantes no radicales, que participan en la iniciación y/o propagación de una cadena de reacciones capaces de desestabilizar otras moléculas celulares, dando como resultado la producción de más ROS. Están compuestos por especies moleculares inestables que contienen uno o más electrones desapareados, lo que los hace altamente reactivos. Las ROS se generan continuamente durante la respiración aeróbica como subproductos de las reacciones redox, siendo sus niveles apropiados vitales para regular varias vías de señalización (Halliwell et al., 2006; Kumar, 2011; Mukwevho et al., 2014; Siti et al., 2015). Sin embargo, un desequilibrio entre la producción de ROS y el sistema de defensa antioxidante endógeno podría conducir a un aumento potencialmente tóxico de los niveles de ROS que podrían inducir daño celular. Asimismo, un aumento de ROS puede estimular una cadena de reacción que provoque, a su vez, la producción de otros ROS, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) o los radicales hidroxilo ( $OH\cdot$ ), generando un daño oxidativo posterior a lípidos y proteínas celulares, así como mutaciones del genoma mitocondrial y nuclear, que finalmente conduzcan a la muerte celular (Halliwell & Gutteridge, 2007; Uttara et al., 2009; Fujimoto et al., 2014; Alvarado et al., 2015).

Las defensas antioxidantes permiten controlar la formación de ROS y evitar el daño celular proveniente de la cadena de reacciones oxidativas. Por este motivo, y dado que las ROS también juegan un rol en la señalización celular, las defensas antioxidantes tienen una función fundamental manteniendo la homeostasis del estado oxidativo (Halliwell et al., 2006; Wahlqvist et al., 2013). Existe una gran variedad de antioxidantes que difieren en su composición, propiedades (físicas y químicas), mecanismos y lugar de acción (Lobo et al., 2010;

Lu & Holmgren, 2014; Mukwevho et al., 2014). Dentro de las defensas antioxidantes endógenas, existen componentes enzimáticos como la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa, las tioredoxinas y las glutarredoxinas y otros no enzimáticos como el glutatión, algunas vitaminas, entre otros (Finkel, 2003; Bendix et al., 2012; Lazar et al., 2014; Mukwevho et al., 2014). Los antioxidantes consisten en moléculas lo suficientemente estables como para ceder un electrón a un radical libre y neutralizarlo, evitando así el daño oxidativo.

#### 2.4.2. Alteraciones en el estado oxidativo en animales expuestos al ruido

El estrés oxidativo en la cóclea es uno de los mecanismos propuestos como causales de la pérdida auditiva inducida por el ruido, una condición que se desarrolla progresivamente durante un largo período de tiempo como consecuencia de la exposición al ruido de manera continua o intermitente, a altas intensidades. En varios estudios se ha planteado que la exposición al ruido puede afectar la cóclea y su función a través de la generación de ROS, llevando a la muerte de las células ciliadas (Henderson et al., 2006; Samson et al., 2008; Fetoni et al., 2013; Choi & Choi, 2015; Kamogashita et al., 2015).

Seidman y Standring (2010) postularon que la intensa actividad metabólica coclear inducida por la exposición al ruido puede ser un factor decisivo para provocar pérdida de la audición, inducir una alteración del estado oxidativo celular y conducir a la formación de ROS. Del mismo modo, Kurioka et al. (2014) reportaron que la exposición al ruido elevado podría inducir un aumento en la producción de ROS mitocondrial y causar excitotoxicidad, lo que llevaría a la muerte de las células ciliadas en el órgano de Corti. Además, se ha demostrado que en la estría vascular, los niveles de ROS se incrementaron luego de la exposición al ruido (Yamane et al., 1995), los radicales hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) aumentaron en la cóclea (Ohlemiller et al., 1999), el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) generó daño celular en el oído interno *in vitro* (Dehne et al., 2000), el antioxidante endógeno GSH incrementó sus niveles en la pared lateral (Yamasoba et al., 1998) y la

actividad de la GSH peroxidasa aumentó después de la exposición al ruido en las células ciliadas (Yamashita et al., 2004). Fetoni et al. (2013) observaron que los niveles reducidos de coenzima Q, un regulador de los niveles de ROS endógeno, pueden conducir a la inactivación de las enzimas de la cadena respiratoria que inducen un ciclo de retroalimentación positiva, en el que el descenso de la actividad enzimática antioxidante induce un incremento en la producción de ROS. Asimismo, estos autores encontraron que la exposición de ratas al ruido (100 dB) durante 10 días, durante una hora diaria, indujo estrés oxidativo y daño histológico en la cóclea (Fetoni et al., 2015).

Teniendo en cuenta estos estudios, los niveles excesivos de ROS en las estructuras cocleares podrían tener un papel relevante en el progreso de la pérdida auditiva. La acumulación de ROS en la cóclea haría que sus defensas antioxidantes intrínsecas sean inadecuadas para neutralizarlas, dando lugar al daño coclear. De esta manera, cuando las estructuras cocleares enfrentan un trauma acústico, la activación de los sistemas de defensa endógena puede ocurrir inicialmente como un intento de contrarrestar el daño celular, aunque generalmente este sistema falla en restaurar la homeostasis redox y la actividad de estas defensas resulta insuficiente para prevenir el daño coclear (Molina et al., 2016b).

Además de los cambios en las estructuras auditivas, las ROS han sido involucradas en la etiología de distintos desórdenes del SNC y en el envejecimiento (Sathyaikumar et al., 2007). Si bien son escasos, algunos estudios reportaron los efectos del ruido en el balance oxidativo celular de estructuras extra-auditivas del SNC (Mandikandan et al., 2006, 2013; Samson et al., 2007; Uran et al., 2010, 2014; Cheng et al., 2016; Liu et al., 2016; Wang et al., 2016). Como se desarrolló en el apartado anterior, estos cambios en el estado oxidativo se han asociado tanto al daño celular como a las modificaciones en el comportamiento de los animales. En estos estudios se encontró un aumento en la peroxidación de lípidos y alteraciones en la actividad enzimática de SOD, CAT y glutatión peroxidasa, en diferentes regiones del HC y la CPF. Además, estos cambios se observaron tanto el mismo día de la exposición como varios días

después, mostrando variaciones en los niveles de estos parámetros a lo largo del tiempo. Por su parte, Lui et al. (2016) encontraron variaciones en la actividad de SOD y la peroxidación de lípidos solamente el mismo día de la exposición, sin encontrar cambios a largo plazo. Finalmente, Manikandan et al. (2006) expusieron ratas al ruido (100 dB) 4 horas diarias una única vez o durante 15 o 30 días. Si bien la peroxidación lipídica y la actividad de SOD estuvo aumentada en todos los grupos, la actividad de CAT y glutatión peroxidasa mostró un perfil diferente según el tipo de exposición.

Desafortunadamente, así como hay pocos estudios que evalúen cambios en el estado oxidativo de células de estructuras extra-auditivas del SNC, hay menos aún en animales expuestos durante el desarrollo. En nuestro laboratorio, los resultados publicados en Uran et al. (2014) mostraron cambios en los niveles de ROS, SOD y CAT, tanto el mismo día de la exposición como a largo plazo, que variaron según el tipo de exposición (aguda o sub-aguda) y fluctuaron a lo largo del tiempo, mostrando cambios incluso 75 días post-exposición. A partir de estos estudios, se postuló que una disminución en los niveles de ROS en el HC, observada 15 días después de la exposición al ruido, pudo haber surgido como una respuesta compensatoria a un aumento inicial inducido por el ruido en las actividades de las enzimas antioxidantes. Es importante destacar que un aumento persistente en los niveles de CAT en el HC de los animales expuestos podría estar involucrado en la normalización de los valores de ROS, observada después de 60 días. Sin embargo, la disminución de la actividad de SOD, otra enzima antioxidante del HC, podría sugerir que se produjo un desequilibrio oxidativo con el objetivo de estabilizar el estado oxidativo.

Resulta importante considerar que además del rol tradicional de las ROS como subproductos peligrosos, estas especies pueden desencadenar varias cascadas de reacción fisiológicas. Particularmente, se requieren ROS en diferentes vías de señalización para actuar como segundos mensajeros. Por lo tanto, bajos niveles de ROS podrían ser dañinos, dado que las ROS son esenciales para el organismo (Pourova et al., 2010). A su vez, también se debe considerar que los bajos niveles de ROS generados por una alta capacidad

antioxidante endógena podrían gatillar mecanismos compensatorios tendientes a reparar o rescatar a la célula (Le Prell et al., 2003). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se podría plantear que la exposición al ruido sería capaz de generar un desbalance oxidativo, que podría subyacer a diferentes alteraciones conductuales, ya sea generando un aumento, como se observó en otros modelos de injuria (Guelman et al., 2003, 2005; Caceres et al., 2010) o una disminución de las ROS (Uran et al., 2010, 2014). Dicho desbalance oxidativo también podría involucrar un aumento o disminución de las defensas antioxidantes endógenas, tanto pertenecientes a las familias tradicionales (SOD, catalasa) como a las familias de las tioredoxinas y las glutaredoxinas, las cuales han surgido en los últimos años como relevantes en la defensa contra el estrés oxidativo y la regulación *redox* (Godoy et al., 2011).

En consecuencia, alteraciones en estos sistemas de protección antioxidante podrían estar implicadas en la patogénesis de la injuria producida por el ruido, como se observó en otros modelos de daño (Ma et al., 2012). Por lo tanto, el estudio del estado oxidativo en el HC de animales expuestos al ruido a distintas edades y mediante distintos esquemas podría arrojar información acerca del mecanismo gatillado tanto por el agente ambiental como por el propio individuo.

## **2.5. Sistemas de neurotransmisión aminoacidérgicos: Otro posible mecanismo que podría estar implicado en los efectos perjudiciales del ruido**

La excitación y la inhibición son dos formas de señalización fundamentales en el SNC. Si bien existen muchos neurotransmisores en el sistema nervioso, el glutamato y el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) son los neurotransmisores que median la mayoría de las señales excitatorias e inhibitorias dentro del SNC. Las neuronas excitatorias garantizan la transmisión de señales a través de varias etapas de procesamiento, mientras que las neuronas inhibitorias son las encargadas de controlar esta transferencia de información (Fishell y Rudy, 2011).

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC. En el cerebro de los mamíferos, es sintetizado principalmente a partir del glutamato en una reacción que es catalizada por dos enzimas glutamato decarboxilasa: GAD 65 y GAD 67 (Erlander et al., 1991). El GABA es almacenado en vesículas sinápticas y es liberado de las terminales nerviosas por exocitosis calcio-dependiente. Los efectos del GABA pueden ser mediados por receptores ionotrópicos o metabotrópicos, los cuales pueden localizarse pre- o post-sinápticamente (Owens & Kriegstein, 2002). Los componentes de la señalización GABAérgica aparecen muy temprano en el desarrollo del cerebro y persisten a lo largo de la vida del individuo. Por otra parte, además de su función en la señalización inhibitoria, se ha reportado que GABA tendría un rol despolarizante durante el desarrollo de varias regiones del cerebro (Yuste & Katz, 1991; Lin et al., 1994; Leinekugel et al., 1995; Owens et al., 1996; Ben-Ari, 2002). Más aún, se ha evidenciado que la señalización GABAérgica puede influenciar varios procesos del cerebro en desarrollo, incluyendo la proliferación celular, la sinaptogénesis y la formación de circuitos (LoTurco et al., 1995; Behar et al., 2000; Haydar et al., 2000; Maric et al., 2001).

Por su parte, el glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC y es sintetizado a partir de la glucosa a través del ciclo del ácido tricarboxílico (Graybeal et al., 2012; Neale et al., 2013; Rubio-Casillas & Fernández-Guasti, 2016). El glutamato se almacena en vesículas pre-sinápticas de neuronas excitatorias y es liberado por exocitosis calcio-dependiente. Una vez en la sinapsis y luego de haberse unido a sus receptores, el glutamato es rápidamente reciclado por los transportadores excitatorios de aminoácidos (EAAT) presentes en astrocitos y neuronas (Katsel et al., 2011; Roberts et al., 2014). La estimulación de los receptores post-sinápticos causa la activación de cascadas de señalización que aumentan la actividad de proteínas quinasas y de la proteína CREB (*cyclic AMP response element binding protein*, en inglés). Entre otras acciones, estas quinasas fosforilan subunidades de los receptores de glutamato, NMDA y AMPA, los cuales sensibilizan su respuesta a la señalización dependiente de la actividad y aumentan la expresión de factores de transcripción. La actividad de estas señales

influencia el tráfico de receptores en la membrana, el flujo del calcio y modulan la sensibilidad post-sináptica (Tamminga et al., 2012). Asimismo, se ha postulado que la plasticidad sináptica producto de la transmisión glutamatérgica podría activar múltiples vías de señalización influenciando el crecimiento celular, la supervivencia neuronal y la morfología de las espinas dendríticas (Engert & Bonhoeffer, 1999; Hardingham & Bading, 2003; Matsuzaki et al., 2004; Graybeal et al., 2012; Mattison et al., 2014).

El correcto funcionamiento de los sistemas de neurotransmisión glutamatérgico y GABAérgico en las diferentes estructuras del SNC, entre ellas el HC, es fundamental para que se puedan llevar a cabo de manera normal las funciones cognitivas. En este sentido, el equilibrio entre la excitación y la inhibición resulta esencial para evitar consecuencias patológicas (Ben-Ari, 2002; Rubio-Casillas & Fernández-Guasti, 2016). Se ha reportado que los agentes que bloquean las sinapsis GABAérgicas generan convulsiones, mientras que los agentes que potencian la inhibición tienen acciones sedantes, anticonvulsivantes y ansiolíticas. Por el contrario, la activación excesiva de las sinapsis glutamatérgicas conduce a la excitotoxicidad, induciendo disfunción y degeneración neuronal (Plitman et al., 2014). El término excitotoxicidad hace referencia a un aumento anormal de la concentración de glutamato en el medio extracelular, lo cual altera los mecanismos que permiten mantener una homeostasis del calcio intracelular, generando una cascada de eventos que pueden desencadenar en última instancia la muerte celular (Olney, 1969; Lau & Tymianski, 2010). Además, existe una estrecha relación entre la excitotoxicidad y el estrés oxidativo, ya que los mecanismos que desencadena la excitotoxicidad favorecen la producción de ROS, las cuales producen múltiples reacciones dañinas a las proteínas, los lípidos, los carbohidratos y los ácidos nucleicos, alterando las funciones celulares (Martindale et al., 2002; Lipton et al., 2008; Stojanovic et al., 2014). A su vez, las ROS pueden favorecer la excitotoxicidad (Nguyen et al., 2011; Stojanovic et al., 2014).

Diferentes patologías se han asociado con un desbalance en estos sistemas de neurotransmisión en individuos adultos, que incluyen diferentes trastornos mentales y neurológicos, enfermedades neurodegenerativas, traumas y

la exposición a diferentes tipos de estresores, entre otros (Cherubini et al., 2011; Graybeal et al., 2012; Rubio-Casillas & Fernández-Guasti, 2016). Por otro lado, estos sistemas cumplen funciones indispensables tanto durante el desarrollo del SNC, como durante la neurogénesis presente en el HC de individuos adultos, dado que forman parte de los procesos necesarios para el crecimiento neuronal y la formación de las sinapsis (Ben-Ari, 2002; Lara et al., 2012). Más aún, el correcto desarrollo de estos procesos dependería no solo de la programación genética, sino también de la actividad sináptica de las neuronas, la cual estaría influenciada por el ambiente (Ben-Ari, 2002).

Se han encontrado en la bibliografía pocos estudios que evalúen los efectos del ruido en el balance de estos sistemas de neurotransmisión en el HC. Cui et al. (2009) encontraron un desbalance a favor del glutamato en ratas adultas expuestas de manera crónica al ruido (4 horas diarias por 30 días), lo cual podría ser responsable de la disminución en la concentración de los cuerpos de Nissl (indicadores de disfunción neuronal) y los consecuentes déficits en el aprendizaje y la memoria espacial de estos animales. Además, estos autores evaluaron los niveles de NR2B, una subunidad de los receptores NMDA, encontrando una disminución en las áreas CA1, CA3 y GD de los animales expuestos. Esta disminución podría ser resultado de la pérdida de neuronas hipocampales por la excitotoxicidad o a causa de una internalización de dichos receptores como mecanismo compensatorio por los elevados niveles de glutamato en el medio extracelular.

Teniendo en cuenta que estos sistemas de neurotransmisión juegan un rol fundamental en procesos implicados en el desarrollo del SNC y en la neurogénesis en etapas posteriores, además de que su correcto balance es indispensable para que se puedan llevar a cabo de manera normal las funciones cognitivas, sería relevante estudiar los efectos de la exposición al ruido durante el desarrollo sobre estos sistemas. Más aún, estos mecanismos podrían estar relacionados a las alteraciones que presentan los animales expuestos al ruido durante el desarrollo.



## **2.6. Las células gliales: la gliosis reactiva como mecanismo de defensa ante la excitotoxicidad**

Las células gliales (microglía, oligodendrocitos y astrocitos) juegan un rol fundamental en el SNC, dado que influyen en las interacciones neuronales tanto a nivel de una única célula como a nivel de red, afectando la conectividad y la comunicación de las neuronas en el cerebro maduro y en el desarrollo (Verkhratsky & Parpura, 2010; Linne & Jalonen, 2014). Se han realizado diversos estudios en los que se ha descripto el rol modulador que llevan a cabo los astrocitos en la homeostasis cerebral, pero más específicamente en el metabolismo, la plasticidad y la supervivencia de las neuronas, sugiriendo que la información procesada localmente en las sinapsis y en las áreas extra-sinápticas del cerebro estaría fuertemente regulada por los astrocitos (Hertz et al., 2013; Rose & Karus, 2013).

Los astrocitos son el tipo de glía más numeroso en el cerebro de los mamíferos y su número es aún mayor que el de las neuronas en dicha estructura. Ocupan territorios espaciales no superpuestos en los que un único astrocito contacta con cientos de procesos neuronales y múltiples cuerpos celulares de neuronas (Halassa et al., 2007). Se ha observado en diferentes estudios que los astrocitos proporcionan energía para la función neuronal y modulan la formación y la eficacia de las sinapsis (Pfrieger & Barres, 1996; Smith, 1998; Haydon, 2001; Volterra & Meldolesi, 2005; Li et al., 2008). Además, jugarían un papel fundamental en la regulación del glutamato extracelular, a través de los transportadores de glutamato (Ventura & Harris, 1999; Anderson & Swanson, 2000) y el reciclado de glutamato a través de glutamina e intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico (Schousboe et al., 1997; Sonnewald et al., 1997; Hertz & Zielke, 2004; Liang et al., 2006). Al eliminar el exceso de glutamato del espacio extracelular, los astrocitos protegen a las neuronas contra las concentraciones de glutamato excitotóxico que pueden conducir a la muerte celular (Rosenberg et al., 1992; Mennerick et al., 1996; Rothstein et al., 1996; Porter y McCarthy, 1997). Este programa defensivo se conoce como *gliosis reactiva* y define en gran medida

el potencial fisiopatológico de la astroglia (Verkhratsky & Parpura, 2010). La astrogliosis, desencadenada en respuesta a lesiones cerebrales de diversas etiologías, es esencial para limitar el área de daño y para la remodelación y recuperación posterior de la función neural (Sofroniew, 2009; Sofroniew et al., 2010; Verkhratsky & Parpura, 2010). Además, esta respuesta defensiva no consiste en un programa único que se desencadena de forma "todo o nada" y es similar en todas las situaciones, sino que las glías reactivas pueden mostrar una amplia gama de respuestas que dependen tanto del tipo y la gravedad de la injuria, como de las combinaciones específicas de señales moleculares que las afectan (Anderson & Sofroniew, 2014; Burda & Sofroniew, 2014; Pekny et al., 2014).

Teniendo en cuenta que la temprana exposición al ruido podría generar una alteración en la neurotransmisión aminoacidérgica, la cual podría estar caracterizada por un aumento excesivo de los niveles de glutamato, resultaría interesante investigar si dicha injuria es capaz de desencadenar una gliosis reactiva con el objetivo de contrarrestar los daños inducidos y mantener el balance del sistema de neurotransmisión aminoacidérgico.

## **2.7. Ambiente enriquecido**

El ambiente enriquecido (AE) es una estrategia que se ha utilizado para mejorar el rendimiento motor y cognitivo de diferentes especies de animales, y para contrarrestar los efectos de diversos estímulos dañinos (Laviola et al., 2008; Horvath et al., 2013). El AE ha demostrado ser una herramienta de protección eficaz contra diferentes lesiones del SNC (Lores-Arnaiz et al., 2006; Baldini et al., 2013). Consiste en modificar las condiciones de alojamiento de los animales favoreciendo una mayor estimulación sensorial, motora, cognitiva y social, que han demostrado generar cambios en la anatomía y el funcionamiento del cerebro.

La idea de que la estimulación ambiental puede generar modificaciones en el tamaño del cerebro y las habilidades cognitivas fue planteada hace más de dos

siglos y desde entonces se han realizado diferentes estudios para estudiar cuáles son y cómo se desarrollan dichos cambios (Renner & Rosenzweig, 1987).

Donald Hebb (1947) fue el primero en proponer el "ambiente enriquecido" como un paradigma experimental a partir de sus experiencias con ratas de laboratorio. Hebb llevó ratas a su casa para "enriquecer" sus condiciones ambientales y encontró que estos animales tenían un mejor desempeño en tareas de memoria que otras ratas que fueron criadas en las condiciones normales de laboratorio (revisado en McCreary & Metz, 2016). A partir de estos hallazgos, Hebb postuló que los animales criados en condiciones de enriquecimiento ambiental desde la infancia podrían desarrollar cambios duraderos en el cerebro que se expresarían en una mayor capacidad de resolución de problemas (Hebb, 1947). Si bien no se trataría de un experimento controlado, incluyó características claves del enriquecimiento ambiental: un ambiente de mayor novedad y complejidad en relación a las condiciones normales de laboratorio (Nithianantharajah and Hannan, 2006).

Sin embargo, no fue hasta la década de 1960 que el AE se comenzó a utilizar como un paradigma experimental contrastable (Sampedro-Piquero & Begega, 2017). Los primeros estudios los realizaron Rosenzweig y sus colegas (Krech et al., 1962; Rosenzweig et al., 1962; Diamond et al., 1964; Rosenzweig, 1966), quienes utilizando este paradigma pudieron demostrar que la manipulación de las condiciones ambientales era capaz de provocar cambios neuroquímicos y en el peso del cerebro. A partir de estos trabajos, diversos autores han utilizado el AE en una gran variedad de campos, en animales de diferentes edades, hallando diversas respuestas plásticas en el cerebro adulto, que incluyen modificaciones en parámetros bioquímicos, la arborización dendrítica, la gliogénesis, la neurogénesis y mejoras en el aprendizaje (van Praag et al., 2000; Crofton et al., 2015; Sampedro-Piquero & Begega, 2017).

El AE consiste en un alojamiento de mayor tamaño que los que se utilizan normalmente en el laboratorio, que contiene diferentes objetos y espacios que favorecen el ejercicio, la exploración y el juego, así como también permite a los animales tener un mayor control sobre el entorno. Estas jaulas suelen incluir

diferentes compartimientos, rampas, túneles y objetos tales como ruedas, juguetes, madrigueras y otros elementos de diferentes colores y texturas. Los distintos objetos suelen ser reemplazados y reorganizados periódicamente para incrementar la novedad (Livingston-Thomas et al., 2016; Korloski & Sutula, 2016). Además, en muchos paradigmas de AE suele aumentar el número de animales por caja, favoreciendo interacciones sociales constantes e impredecibles. Esta disposición proporciona tres facetas claves de enriquecimiento: La novedad, el contacto social y el ejercicio. Se ha demostrado en diferentes estudios que estos tres aspectos son gratificantes y favorecen la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Rebec et al., 1997; Crofton et al., 2015; Sampedro-Piquero & Begega, 2017).

No hay consenso respecto a qué paradigma de AE es el más conveniente para encontrar efectos positivos en la anatomía y el funcionamiento del cerebro. Los diferentes protocolos de laboratorio varían en cuanto a los objetos y otros elementos de enriquecimiento, así como también en la cantidad de animales, la edad en la que son alojados en el mismo y los periodos de tiempo durante los cuales permanecen en estas cajas, que puede variar desde días hasta semanas o meses.

Se ha reportado que el AE favorece la activación neuronal, la señalización y la plasticidad de diferentes áreas del cerebro. Por un lado, el aumento de la estimulación sensorial que se produce por el contacto con diferentes objetos aumentaría la activación de las cortezas somatosensorial y visual. A su vez, el aumento de la estimulación cognitiva, por ejemplo, por la codificación de la información relacionada con mapas espaciales, el reconocimiento de objetos, la novedad y la modulación de la atención, favorecería la activación del hipocampo y otras áreas corticales. Por último, la mayor actividad física, como los movimientos exploratorios (que incluyen habilidades motrices finas) y las carreras en las ruedas, entre otros, estimularían áreas como la corteza motora y el cerebelo (Nithianantharajah & Hannan, 2006).

Según van Praag et al. (2000), el hecho de que el AE consista en una compleja estimulación inanimada y social, implica que los aportes de cada uno de

los factores que conforman el AE no se pueden aislar fácilmente, siendo la relación entre todos estos factores un elemento esencial. En este sentido, distintos estudios han evaluado los efectos de estos factores de manera aislada, y en general, no han podido reproducir los efectos generados por la combinación de factores que forman parte del AE.

Se han encontrado una gran variedad de efectos del AE que incluyen cambios genéticos, moleculares, celulares, en la conectividad y en el comportamiento de animales sanos y en diferentes modelos de daño cerebral (Nithiamantharag & Hannan, 2006; Kotloski & Sutula, 2015; Sampedro-Piquero y Begega, 2015).

A nivel comportamental, los principales beneficios del AE se reportaron respecto al aprendizaje y la memoria. En animales adultos sanos se han observado mejoras en pruebas de memoria espacial como el laberinto acuático de Morris (Mohammed et al., 1990; Kempermann et al., 1997, 1998; Schrijver et al., 2002; Frick et al., 2003), el laberinto de Barnes (Baraldi et al., 2013) y el laberinto radial de ocho brazos (Janus et al., 1995) así como también en tareas de reconocimiento de objetos novedosos (Schrijvera et al., 2002; Lyst et al., 2012) y de memoria de miedo contextual (Duffy et al., 2001), cuando se compararon animales alojados en AE con animales ubicados en jaulas no enriquecidas. Además, el AE resultó ser una buena estrategia para disminuir el déficit que se produce en la memoria a causa del envejecimiento (Sampedro-Piquero & Begega, 2015). Por otra parte, también se observó que el enriquecimiento ambiental puede disminuir las conductas relacionadas a la ansiedad y aumentar la actividad exploratoria de los animales (Chapillon et al., 1999; Benaroya-Milshtein et al., 2004; Fiske & Gammie, 2005; Lima et al., 2014).

Asimismo, se han estudiado los efectos del AE en modelos animales de diferentes alteraciones que afectan al SNC, como la exposición a distintos tipos de estrés, el efecto de drogas, lesiones cerebrales, modelos transgénicos y enfermedades neurodegenerativas, entre otros. En diversos estudios se investigó la capacidad del AE como tratamiento para mejorar los déficits inducidos en los animales por diferentes injurias, mientras que en otros se estudió la capacidad

preventiva del AE en animales que se alojaron en el AE previamente a que se genere la injuria (Crofton et al., 2015).

El AE se ha utilizado en una gran variedad de modelos animales y en general se ha observado que tiene efectos beneficiosos. Por ejemplo, se ha encontrado que el alojamiento en un AE posterior a una lesión cerebral o isquemia es capaz de reducir los déficits en la memoria espacial (Will et al., 1977; Hanna et al., 1996; Livingston-Thomas et al., 2016) y la habilidad motora (Gentile et al., 1987; Johansson & Ohlsson, 1996; Johansson, 1996; Fischer & Peduzzi, 2007; Knieling et al., 2009). También se han hallado efectos beneficiosos en diferentes modelos de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington (van Deller et al., 2000; 2004), de Alzheimer (Levi et al., 2003; Arendash et al., 2004; Jankowsky et al., 2005) y de Parkinson (Tillerson et al., 2003; Jadavji et al., 2006), en los que se halló que la estimulación ambiental podría ser beneficiosa para la habilidad motora, la actividad exploratoria, la memoria espacial y de trabajo. Además, el AE ha mostrado tener efectos positivos para el aprendizaje y la memoria espacial y de reconocimiento de objetos en modelos de ratones transgénicos que tienen alteraciones en el aprendizaje (Kempermann et al., 1998; Rampon et al., 2000).

Si bien aún no se han reportado estudios en los que se haya utilizado el AE como un posible tratamiento para las alteraciones conductuales provocadas por una exposición previa al ruido, sí se ha utilizado como intervención ante los cambios producidos por otro tipo de estresores, principalmente cuando estos se presentaron de manera crónica. Bahi (2017) evaluó los efectos del estrés psicosocial y el posterior alojamiento en AE durante dos semanas, encontrando efectos beneficiosos, observándose una disminución tanto en las conductas relacionadas a la ansiedad como en la preferencia y consumo de alcohol por parte de los animales estresados. Por otra parte, Liu et al. (2017) encontraron que tres semanas de AE eran suficientes para revertir el comportamiento depresivo de ratas expuestas a estrés impredecible. Por último, el AE también mostró ser una buena herramienta neuroprotectora para prevenir los efectos del estrés por inmovilización, disminuyendo los déficits en el aprendizaje y la memoria espacial

así como las conductas relacionadas a la ansiedad en los animales estresados (Bhagyo et al., 2016; Shilpa et al., 2017).

Los diferentes efectos conductuales que se hallaron en los estudios citados fueron acompañados de análisis neurobiológicos en diferentes estructuras del cerebro con los cuales se encontraron correlaciones, mostrando que el AE afectaría a los animales en sus distintos niveles de organización. Además, resulta importante destacar que varios de los parámetros conductuales en los que se encontraron cambios se han asociado al HC: las funciones cognitivas de aprendizaje y memoria vinculadas con la navegación, la exploración y la locomoción se encuentran relacionadas con el HC dorsal, mientras que el comportamiento motivacional y emocional se ha asociado con la región ventral del HC (Fanselow & Dong, 2010).

Dentro de los análisis neurobiológicos realizados, se han encontrado modificaciones en diferentes parámetros anatómicos, genéticos, moleculares, celulares y en la conectividad del cerebro de animales sanos, como también en animales con algún tipo de daño en el SNC que se alojaron en AE. A nivel anatómico, se encontró un aumento en el peso, el grosor y la organización dendrítica de diferentes regiones del cerebro y, en particular, del HC (Rosenzweig et al., 1962; Diamond et al., 1964, 1966; Will et al., 1977; Jung et al., 2014; Sampedro-Piquero & Begega, 2017). Otros estudios permitieron observar que a nivel celular el AE incrementa las arborizaciones dendríticas y su longitud (Greenough et al., 1973; Restivo, 2005), el tamaño del soma neuronal (Faherty et al., 2003), la cantidad de espinas dendríticas (Glogus et al., 1973; Johansson & Belichenko, 2002; Leggio et al., 2005) y de sinapsis (Altschuler, 1979; Turner & Greenough, 1985; Nakamura et al., 1999), lo cual podría traer consecuencias funcionales en la capacidad de procesamiento de los animales enriquecidos (Sampedro-Piquero & Begega, 2017).

Más aún, varios de estos cambios a nivel celular se han correlacionado con modificaciones en la expresión de genes involucrados en la función sináptica y la plasticidad celular (Nithianantharajah & Hannan, 2006). Por ejemplo, el AE puede aumentar la expresión de genes como el factor neurotrófico derivado del cerebro

(BDNF; Falkenberg et al., 1992; Shilpa et al., 2017; Dandi et al., 2018), el factor de crecimiento nervioso (NGF; Torasdotter et al., 1998; Pham et al., 1999; Birch et al., 2013), el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF; Young et al., 1999), Arc (Pinaud et al., 2001) y la neurotrofina-3 (NF-3; Torasdotter et al., 1992; Ickes et al., 2000) en la corteza cerebral y en el HC. Asimismo, el AE sería capaz de modificar la expresión de proteínas sinápticas, receptores y neurotransmisores, generando cambios en diferentes sistemas de neurotransmisión, entre ellos el sistema glutamatérgico y el GABAérgico (Frick et al., 2003; Bredy et al., 2004; Nithianantharajah et al., 2004; Naka et al., 2005; Segovia et al., 2006; Kotloski & Sutula, 2015).

Por otra parte, el AE se ha relacionado con un aumento de la neurogénesis en el HC y la integración de estas nuevas células en circuitos funcionales, así como también con una disminución de las células apoptóticas (Kempermann et al., 1997, 2002; Young et al., 1999; Van Praag et al., 1999; Paez-Martinez, 2013; Tanti et al., 2013). Segovia et al. (2006) alojaron ratas Wistar jóvenes y longevas en AE durante dos meses y encontraron que en ambos grupos había un aumento de la neurogénesis en GD en comparación a sus respectivos controles alojados en condiciones no enriquecidas. Además, se ha encontrado que el enriquecimiento ambiental puede aumentar la gliogénesis y la morfología de las células gliales en la corteza y el HC (Ehninger & Kempermann, 2003; Theodosis et al., 2008; Viola et al., 2009; Williamson et al., 2012).

El aumento de la neurogénesis, la gliogénesis y la sinaptogénesis en el HC han sido asociados al mejor desempeño cognitivo en pruebas de aprendizaje y memoria (Reshef et al., 2014; Kotloski & Sutula, 2015; Sampedro-Piquero & Begega, 2017). Por ejemplo, Fares et al. (2013) alojaron ratas Sprague-Dawley durante 13 semanas en AE o en condiciones convencionales y evaluaron diferentes parámetros conductuales, histológicos y bioquímicos. Los animales criados en un ambiente enriquecido mostraron un mejor desempeño en una tarea de memoria espacial así como también una disminución en conductas relacionadas a la ansiedad, en comparación a las ratas criadas en condiciones normales. Asimismo, se encontró que estos animales presentaron un aumento en



el ancho de la corteza, en la neurogénesis y de la transcripción de varios genes relacionados a la neurogénesis en el HC, en comparación con sus controles. Por otra parte, Shilpa et al. (2017) evaluaron el efecto neuroprotector del AE en ratas estresadas por inmovilización de manera crónica. Encontraron que el AE disminuyó las alteraciones conductuales provocadas por el estrés, entre ellas el déficit en el aprendizaje y la memoria espacial y el comportamiento relacionado a la ansiedad. Además, estos animales mostraron una recuperación en los niveles de BDNF, del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP; proteína que forma parte de la estructura de los astrocitos) y de los receptores de glucocorticoides en diferentes regiones, entre ellas del HC. Finalmente, hallaron que el AE era capaz de restaurar la hipotrofia en el GD presente en los animales estresados alojados en condiciones convencionales. Con estos hallazgos, los autores concluyeron que el enriquecimiento ambiental recuperaría los déficits cognitivos inducidos por el estrés a través de la modulación de la señalización de factores neurotróficos, los astrocitos y los receptores de glucocorticoides.

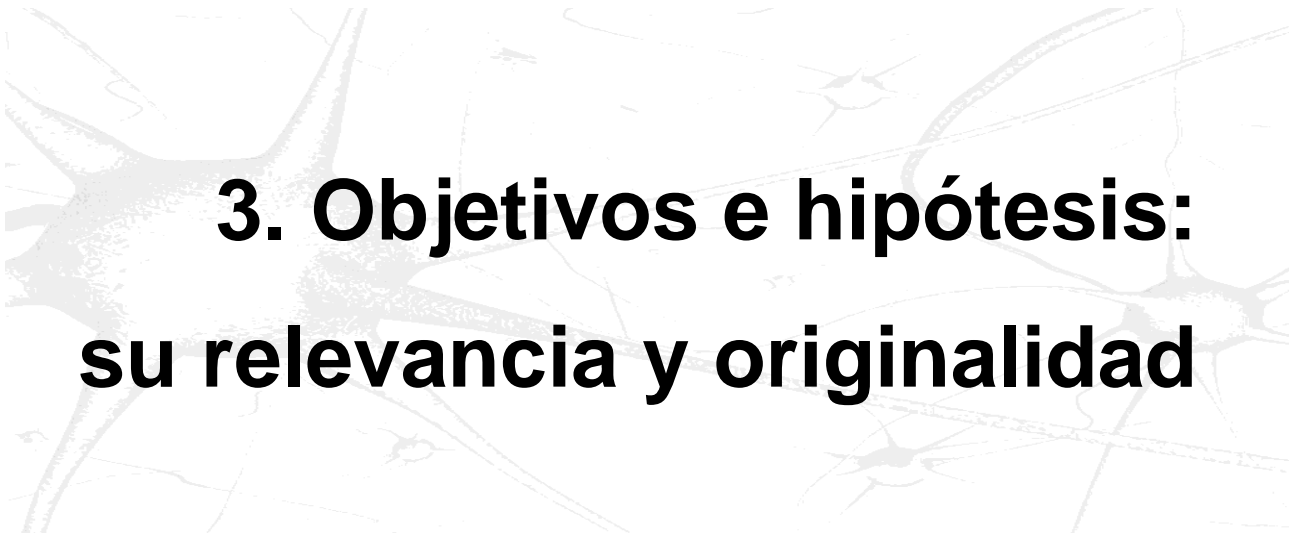
Finalmente, pocos estudios evaluaron la capacidad del AE para generar cambios en el estado oxidativo del HC y otras regiones de la corteza, tanto en animales sanos (Chenget al., 2014; Mármol et al., 2015, 2017; Muhammad et al., 2016) como en animales con alguna alteración en el SNC (Herring et al., 2010; Cechetti et al., 2013). Mármol et al. (2015) midieron diferentes parámetros de estrés oxidativo en ratas hembras y machos que se alojaron durante dos meses y medio en AE. Si bien encontraron diferencias entre ambos sexos, el AE disminuyó los niveles de sustancias reactivas al ácido barbitúrico, de oxidación de proteínas y de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y aumentó los niveles de catalasa, cuando se compararon con los animales alojados en condiciones convencionales, lo cual sería indicio de que los animales alojados en AE tendrían un menor nivel de ROS y se encontrarían más protegidos. Por otra parte, Cechetti et al. (2013) estudiaron la capacidad neuroprotectora del AE en un modelo de hipoperfusión cerebral en ratas. Estos autores encontraron que la oclusión generó un aumento significativo en la cantidad de ROS en el HC y que estos parámetros alterados volvieron a los

niveles de los animales controles cuando las ratas con hipoperfusión se alojaron en AE por una hora, tres veces por semana.

En resumen, el AE sería capaz de generar una gran variedad de cambios en diferentes parámetros partiendo desde el nivel molecular hasta el conductual, tanto en animales sanos como en aquellos que presentan algún daño en el SNC. Cabe aclarar que hay varios estudios en los que no se encontraron efectos positivos del AE. Más aún, muchas veces se encontraron resultados contradictorios entre diferentes investigaciones o se observó que el AE tiene efectos positivos en algunos parámetros pero en otros no. Hay muchas variables en juego que hacen que difieran los protocolos de investigación utilizados y que podrían estar determinando las inconsistencias entre los resultados de distintos autores.

La mayoría de los estudios realizados para medir los efectos del AE se realizaron en animales adultos. Algunos de estos estudios iniciaron el periodo de enriquecimiento ambiental en la adultez y otros a partir de que los animales fueron destetados (DPN 21-23), permaneciendo en el AE hasta la adultez para ser evaluados. Según Spear (2015) la adolescencia de las ratas puede dividirse en tres periodos: la adolescencia temprana, entre DPN 21 y 28, la media, entre DPN 28 y 42 y la tardía que se extiende desde el DPN 43 al 55. Teniendo en cuenta que los animales tienen la autonomía suficiente como para ser trasladados al AE luego del destete, para evaluar los efectos del AE en animales adolescentes solo se podría utilizar este tipo de alojamiento durante un máximo de tres semanas. Si bien se trata de un periodo de tiempo menor al que habitualmente se utiliza para evaluar a los animales adultos, se han encontrado efectos positivos del AE con incluso menos de dos semanas de alojamiento en este tipo de jaulas (Starosciak et al., 2012; Mitra & Sapolsky, 2012; Ashokan et al., 2016; Bhagya et al., 2017; Shilpa et al., 2017). Además, la adolescencia ha sido considerada como un período sensible a la influencia de diferentes estímulos ambientales (Heim & Nemeroff, 1999; Spear, 2000), por lo que pocos días de enriquecimiento ambiental podrían ser suficientes para ejercer cambios en los animales.

En consecuencia, el AE resultó ser una buena estrategia de neuroprotección en diferentes modelos animales, en los cuales mostró traer consecuencias positivas, tanto en el desempeño cognitivo y emocional como en diferentes parámetros neurobiológicos relacionados con la neurogénesis, la gliogénesis, la sinaptogénesis, diferentes sistemas de neurotransmisión, una disminución del estrés oxidativo y una mayor protección del sistema antioxidante.



### **3. Objetivos e hipótesis: su relevancia y originalidad**

### **3. Objetivos e hipótesis: su relevancia y originalidad**

#### **3.1. Significado y originalidad de la propuesta**

El ruido constituye un contaminante ambiental presente en distintos ámbitos, tanto ocupacionales como recreativos. Sin embargo, si bien se conocen los efectos que el ruido puede generar sobre el sistema auditivo, poco se sabe acerca de los efectos extra-auditivos, en especial sobre el SNC. Además, la vulnerabilidad del SNC inmaduro a diferentes injurias destaca la importancia del uso de modelos de animales en desarrollo. Por tal motivo, estudiar el efecto de exposiciones al ruido de distinta duración en individuos en desarrollo resulta clínicamente relevante. Finalmente, la exposición de organismos inmaduros a intensidades moderadas de ruido podría contribuir a establecer los mecanismos mediante los cuales se puede generar el daño, así como a encontrar estrategias de neuroprotección destinadas a contrarrestar dichas alteraciones.

#### **3.2. Objetivos generales y específicos e hipótesis**

El objetivo general de este trabajo consistió en estudiar el daño conductual que puede inducir la exposición al ruido en distintas etapas del desarrollo, de acuerdo a diferentes esquemas, así como investigar los mediadores bioquímicos involucrados y evaluar la implementación de una estrategia de neuroprotección no farmacológica.

***Hipótesis 1:*** La exposición de ratas a intensidades moderadas de ruido produce alteraciones conductuales que son inducidas por un desbalance oxidativo en el HC, caracterizado por una sub o sobre-estimulación del sistema de antioxidantes endógenos y tioredoxinas, que difiere de acuerdo a la etapa del desarrollo en la que el animal fue expuesto, sin alteraciones auditivas significativas.

#### Objetivos específicos:

a) Estudiar posibles alteraciones en conductas relacionadas al HC en animales expuestos a intensidades moderadas de ruido durante dos etapas del desarrollo (primera y segunda semana de vida), en una única o múltiples exposiciones (1 o 5 días), mediante el uso de diferentes paradigmas conductuales, a distintos tiempos luego del destete (1 o 2 semanas post-destete).

b) Evaluar la capacidad auditiva de los animales expuestos a intensidades moderadas de ruido durante dos etapas del desarrollo (primera y segunda semana de vida), en una única o múltiples exposiciones (1 o 5 días), mediante el estudio de potenciales evocados auditivos (1 o 2 semanas post-destete).

c) Analizar el estado oxidativo del HC de los animales expuestos a intensidades moderadas de ruido durante dos etapas del desarrollo (primera y segunda semana de vida), en una única o múltiples exposiciones (1 o 5 días), mediante el análisis de los niveles de ROS y catalasa a tiempos cortos (30 y 60 minutos, 24 hs post-injuria) y de tiorredoxinas (Trx1 y Trx2) a largo plazo (1 y 2 semanas post-destete).

***Hipótesis 2:*** La exposición de ratas a intensidades moderadas de ruido induce alteraciones en la neurotransmisión aminoacidérgica, ya sea generando un desbalance a favor de la excitotoxicidad y/o una gliosis reactiva como mecanismo neuroprotector para contrarrestar el daño inducido.

#### Objetivos específicos:

a) Estudiar posibles cambios en los niveles de la proteína GAD65/67, marcador de neuronas GABAérgicas y en los niveles de EAAT-1, marcador de neuronas glutamatérgicas y astrocitos, en el HC de ratas expuestas a intensidades moderadas de ruido en dos etapas del desarrollo (primera y segunda semana de vida), en una única o múltiples exposiciones (1 o 5 días), a distintos tiempos luego de la exposición.

b) Evaluar posibles cambios en la estructura del HC de ratas adultas expuestas a intensidades moderadas de ruido en dos etapas del desarrollo (primera o segunda semana de vida), en una única o múltiples exposiciones (1 o 5 días), mediante el uso de técnicas histológicas utilizando marcadores astrogliales, a distintos tiempos luego de la exposición.

**Hipótesis 3:** El ambiente enriquecido promueve efectos neuroprotectores sobre el HC de ratas expuestas al ruido durante el desarrollo, siendo capaz de interferir con algunos de los parámetros afectados.

Objetivos específicos:

a) Investigar si la crianza en un AE en el período posterior al destete es capaz de prevenir o revertir las alteraciones conductuales observadas en animales adultos expuestos a intensidades moderadas de ruido en dos etapas del desarrollo (primera o segunda semana de vida), en una única o múltiples exposiciones (1 o 5 días), luego de distintos tiempos post-destete (1 o 2 semanas) de crianza en AE.

b) Evaluar si la crianza en un AE en el período posterior al destete es capaz de prevenir o revertir las alteraciones en los mediadores observadas en animales adultos expuestos a intensidades moderadas de ruido en dos etapas del desarrollo (primera o segunda semana de vida), en una única o múltiples exposiciones (1 o 5 días), luego de distintos tiempos post-destete (1 o 2 semanas) de crianza en AE.



## **4. Los métodos y el diseño de los experimentos**



## **4. Los métodos y el diseño de los experimentos**

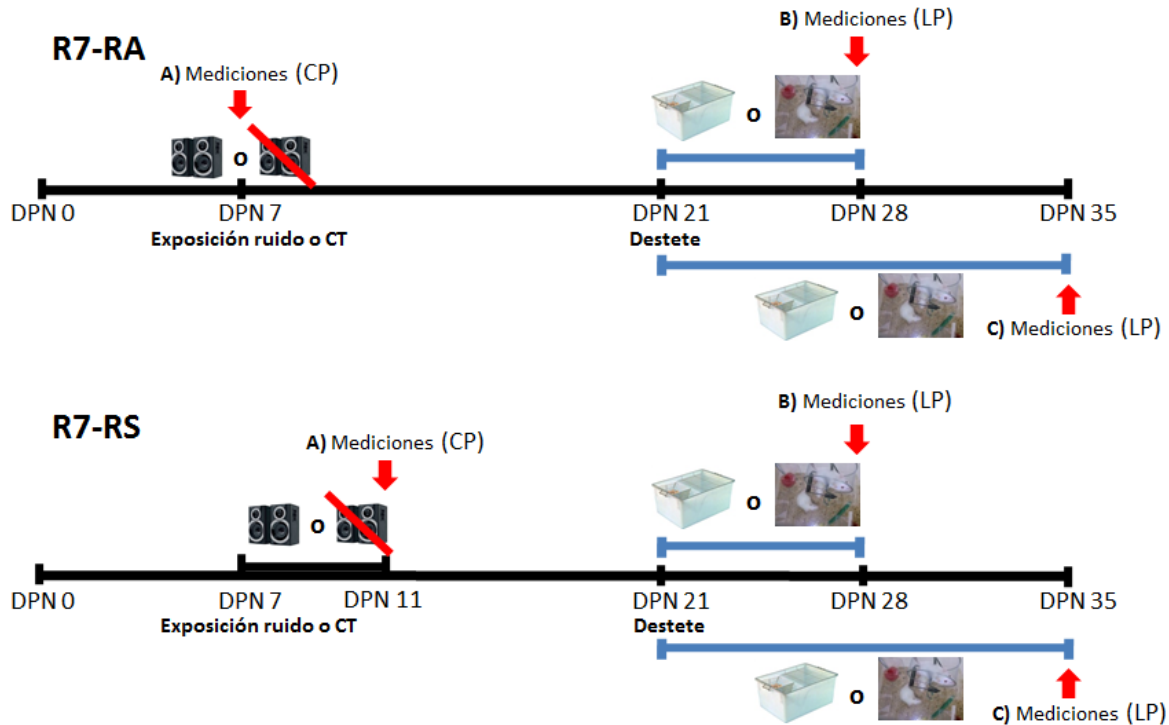
### **4.1. Animales**

Ratas Wistar adultas de ambos sexos fueron adquiridas en el bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (FFyB-UBA) y fueron apareadas en el bioterio del CEFyBO (UBA-CONICET), lugar donde se llevaron a cabo los experimentos, debido a que para el presente proyecto se debían utilizar ratas en etapas tempranas del desarrollo. Solo los machos de las diferentes camadas fueron utilizados, los cuales fueron asignados al azar a los diferentes grupos dentro de las 24-48 hs desde el nacimiento: ruido-primer semana (R7, expuestos en el día postnatal (DPN) 7), ruido-segunda semana (R15, expuestos en el DPN 15) y controles (CT7 y CT15), habiendo un grupo control para cada tipo de tratamiento. A su vez, dentro de cada uno de estos grupos, cada animal fue asignado a uno de los siguientes subgrupos: exposición a ruido agudo (RA) o a ruido sub-agudo (RS), quedando conformados los siguientes grupos experimentales: exposición a ruido agudo durante la primera semana (R7-RA), exposición a ruido sub-agudo durante la primera semana (R7-RS), exposición a ruido agudo durante la segunda semana (R15-RA), exposición a ruido sub-agudo durante la segunda semana (R15-RS), y los respectivos grupos controles para cada tratamiento de ruido (CT7-RA, CT7-RS, CT15-RA y CT15-RS). Además, dentro de cada grupo, un subgrupo fue alojado en condiciones normales (JN) y otro en condiciones de ambiente enriquecido (AE).

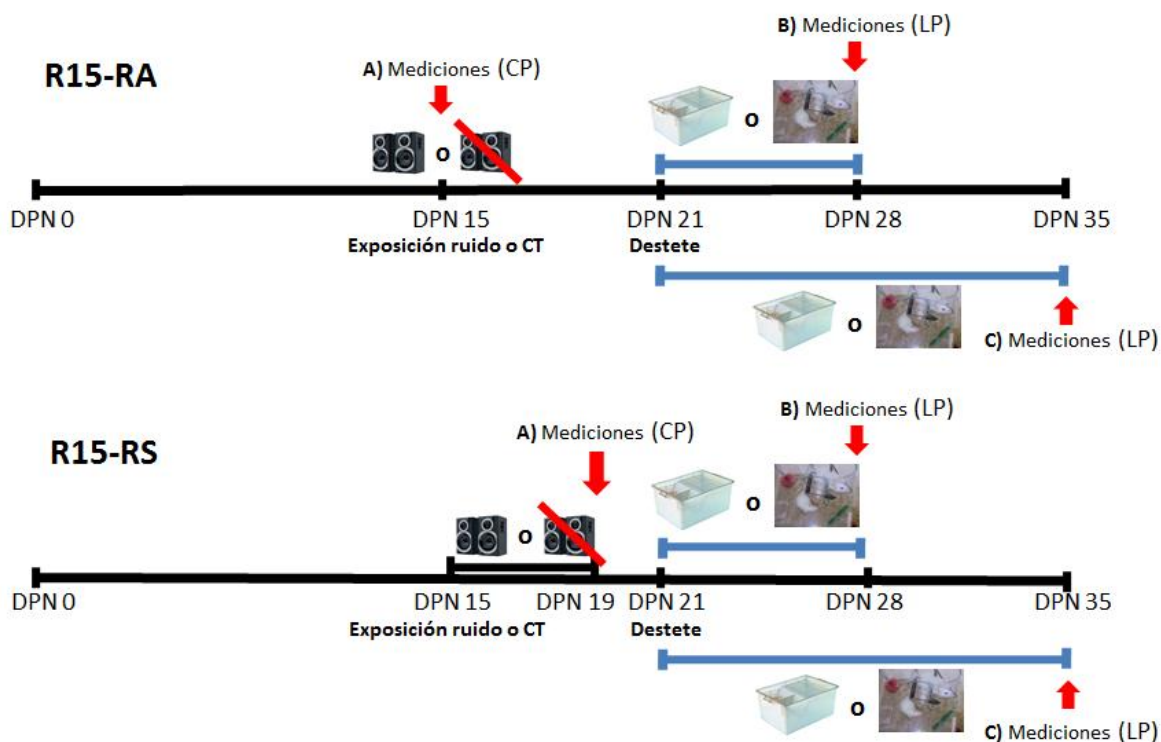
Finalmente, los distintos parámetros a medir fueron asignados al azar a cada sujeto experimental dentro de cada grupo: 1) Tiempos cortos (0,5, 1 o 24 horas post-exposición al ruido) para la evaluación de marcadores de estado oxidativo.

2) Largo plazo (1 o 2 semanas post-destete) para la evaluación de: a) parámetros conductuales; b) capacidad auditiva; c) niveles de tiorredoxinas y marcadores de estado oxidativo; d) marcadores de neurotransmisión aminoacérgica e) posibles cambios en la estructura del HC a través de la evaluación histológica.

Las figuras 3 y 4 ilustran los grupos experimentales.



**Figura 3.** Protocolo de los grupos expuestos a ruido durante la primera semana de vida (R7).  
 Figura superior: grupo expuesto a R7-RA o CT7-RA en el día post-natal 7 (DPN 7).  
 Figura inferior: grupo expuesto a R7-RS o CT7-RS desde el DPN 7 hasta el DPN 11.  
 A: Mediciones a corto plazo de marcadores de estado oxidativo a distintos intervalos (0,5, 1 o 24 hs) luego de la única exposición para R7-RA y CT7-RA o luego de la última exposición (DPN 11) para R7-RS Y CT7-RS. Para todos los tratamientos, el destete se realizó en el DPN 21 y luego los animales se alojaron en JN o AE durante 1 semana (B) o 2 semanas (C) para las mediciones a largo plazo (conducta, capacidad auditiva, tiorredoxinas, estrés oxidativo, neurotransmisión aminoacídica, histología del HC).



**Figura 4.** Protocolo de los grupos expuestos a ruido durante la segunda semana de vida (R15). Figura superior: grupo expuesto a R15-RA o CT15-RA en el día post-natal 15 (DPN 15). Figura inferior: grupo expuesto a R15-RS o CT15-RS desde el DPN 15 hasta el DPN 19. A: Mediciones a corto plazo de marcadores de estado oxidativo a distintos intervalos (0,5, 1 o 24 hs) luego de la única exposición para R15-RA y CT15-RA o luego de la última exposición (DPN 19) para R15-RS Y CT15-RS. Para todos los tratamientos, el destete se realizó en el DPN 21 y luego los animales se alojaron en JN o AE durante 1 semana (B) o 2 semanas (C) para las mediciones a largo plazo (conducta, capacidad auditiva, tiorredoxinas, estrés oxidativo, neurotransmisión aminoacídica, histología del HC).

Dado que los animales fueron sujetos a las distintas condiciones experimentales durante el desarrollo temprano, cada camada recibió el mismo tratamiento. En consecuencia, cada una de ellas fue considerada como una unidad experimental, asignando no más de un macho por camada para la medición de cada una de las variables examinadas. Para cumplir con la premisa de reducción establecida en “3R principles in animal research” (Tannenbaum and Bennett, 2015), en algunos casos el mismo animal se utilizó para una segunda evaluación. Esto se realizó en los casos en donde la primera prueba utilizada fue campo abierto, dado su carácter poco aversivo para las ratas (Roy & Chapillon, 2004).

Todos los animales se mantuvieron con alimento y agua *ad libitum*, en ciclos luz-oscuridad de 12 horas y una temperatura de  $21\pm 2$  °C, con marlo de choclo esterilizado para la cama. La limpieza de las jaulas y el cambio de lecho se realizaron 3 veces a la semana, tanto para las jaulas normales como para los AEs.

Todas las crías que se evaluaron a largo plazo se mantuvieron con sus madres hasta el momento del destete a los 21 días de edad en una JN. Luego del destete, se hospedaron de a 2-3 en cada JN y de a 3-5 en cada jaula de AE, hasta el momento de la evaluación. Para evitar alteraciones del ritmo circadiano, las exposiciones se realizaron siempre dentro del mismo rango horario (desde las 10 a.m. hasta las 2 p.m.). Asimismo, las pruebas conductuales se realizaron siempre entre las 12 y las 4 p.m., para evitar posibles diferencias en el desempeño.

Los animales fueron manipulados y sacrificados de acuerdo a las normas del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL, Facultad de Medicina, UBA). Este comité, a través de la resolución 503/10 aprobó el presente protocolo experimental. El CICUAL se adhiere a las reglas de la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” del NIH (revisión 2011) y la directiva de la Comunidad Económica Europea 86/609/EEC (revisión 2010). Se tomaron medidas para reducir el número de animales utilizado y para minimizar su dolor y/o desconfort. Los animales utilizados para experimentos bioquímicos y moleculares fueron sometidos a eutanasia por decapitación con guillotina. Aquellos utilizados en experimentos conductuales, fueron sometidos a eutanasia en una cámara de CO<sub>2</sub>, diseñada “ad hoc”.

#### 4.2. Exposición al ruido

Para la exposición al ruido, los animales se mantuvieron en su jaula original (40cm x 25cm x 16cm), mientras que la madre fue trasladada a otra jaula que fue mantenida en el bioterio.

La jaula con los sujetos experimentales fue introducida en una cámara de sonido ventilada construida “ad hoc” (1m x 1m x 1m), provista de un sistema de atenuación sonora hecho con Celotex™ e iluminada en su parte superior con el objeto de evitar alteraciones en el ritmo circadiano.

Para la generación del ruido se utilizó una computadora con el software TrueRTA, capaz de generar ruido blanco de banda ancha de 20 Hz a 20000 Hz en octavos de banda. Para la amplificación del sonido se utilizó un monitor activo bidireccional (SKP, SK150A, 40WRMS por canal), suspendido 30 cm por encima de la jaula. La intensidad total de ruido fue de 95-97 dB. Para corroborar que las intensidades de ruido fueran las adecuadas, las mismas se monitorearon periódicamente mediante un micrófono condensador de medición omnidireccional (Behringer ECM 8000), ubicándolo dentro de la cámara de sonido en distintas ubicaciones y tomando un promedio de las diferentes mediciones (Uran et al., 2010).

Animales de 1 (R7) o 2 semanas de vida (R15) fueron expuestos a ruido blanco durante 2 horas sólo un día (agudo, RA) o durante 5 días consecutivos (sub-agudo, RS). En el caso de los grupos RS, la exposición se extendió desde el DPN 7 al 11 para el grupo R7 y desde el DPN 15 al 19 para el grupo R15. Para los animales controles, se simuló este mismo procedimiento colocando a los mismos en la misma cámara de sonido, pero sin la generación de ruido, con el objeto de mantener comparables el resto de las condiciones experimentales. El rango del ruido de fondo estuvo dentro de los 50 y 55 dB SPL, estando dentro del intervalo sugerido por la guía de la Organización Mundial de la Salud (NIOSH, 1998) y por otros autores (Campeau et al., 2002; Sasse et al., 2008). Dada la variación en la cantidad de machos de cada camada, se expuso una cantidad distinta de animales cada vez, exponiéndose simultáneamente entre 2 y 6 ratas.

#### 4.3. Tests conductuales

Todas las pruebas conductuales se realizaron en una sala destinada a este propósito, la cual se encuentra junto al bioterio donde se hospedaron todas las ratas utilizadas para esta tesis. Durante la evaluación conductual, las ratas permanecieron en sus jaulas originales en una mesada ubicada en el bioterio y fueron trasladadas individualmente a la sala de conducta, con previa habituación de 5 minutos en la jaula de traslado y posteriormente 3 minutos en la sala de

conducta. Durante toda la sesión conductual se activó un sonido ambiental constante para evitar la interferencia de sonidos externos.

#### 4.3.1. Test de evitación inhibitoria (EI)

Esta prueba permite evaluar la memoria asociativa de miedo que aparece luego de relacionar un estímulo aversivo (shock eléctrico) con el ingreso a un compartimiento oscuro -no aversivo- en el dispositivo en donde el animal recibió dicho estímulo. A partir de esta asociación, los animales aprenden a evitar el acceso al contexto donde recibieron la descarga, si bien inicialmente este sitio les resultaba “más seguro”, dado que los roedores tienen preferencia por el compartimiento oscuro por ser animales de hábitos nocturnos. Consiste en la prueba de condicionamiento instrumental de miedo más ampliamente utilizada. Esta prueba también es conocida como *evitación pasiva* en oposición a las tareas de *evitación activa* en las cuales los animales deben realizar algún movimiento para evitar un estímulo aversivo (Izquierdo et al., 2016). Sin embargo, tiene poco de “pasivo” el comportamiento de los animales en esta prueba, dado que se encuentran activos durante toda la evaluación: exploran, caminan de un lado al otro, sacan la cabeza para olfatear el otro compartimiento, etc. (Netto & Izquierdo, 1985), siendo la incursión al lado oscuro el único comportamiento que evitan. A partir de diversos estudios se ha planteado que la memoria asociativa de miedo contextual depende de la coordinación y el buen funcionamiento de varias regiones del cerebro, entre las que se encuentra el HC (Barros et al., 2000, 2001; Fiorenza et al., 2012; Izquierdo et al., 1997, 2006; Myskiw, 2012).

Dispositivo utilizado: El dispositivo consiste en una caja (60cm x 60cm x 40cm) dividida en dos compartimientos del mismo tamaño, uno iluminado y otro oscuro (Figura 5). Los compartimientos se encuentran separados por una puerta corrediza. El compartimiento iluminado posee una lámpara y paredes de acrílico transparente, mientras que el compartimiento oscuro tiene paredes negras y una tapa que permite que su interior sea oscuro. Además, el piso de este segundo compartimiento consiste en una rejilla de acero inoxidable a través de la cual se

puede transmitir una corriente eléctrica. Este dispositivo está conectado a un software de computadora diseñado “ad-hoc” el cual permite ajustar la intensidad de la descarga eléctrica a 1.2 mA durante 1 segundo, dar la señal para que se produzca la descarga y medir los tiempos de latencia para pasar de un compartimiento a otro.



**Figura 5.** Dispositivo utilizado para el test de evitación inhibitoria. A la izquierda, el compartimiento iluminado y a la derecha, el compartimiento oscuro.

Nota: para que se vea el interior se extrajo la tapa removible del compartimiento oscuro.

Procedimiento: Para cada una de las sesiones, el animal fue ubicado siempre en la misma posición dentro del lado iluminado. Se realizaron tres sesiones: una *sesión de habituación* al dispositivo, una *sesión de entrenamiento* y una *sesión de retención*, separadas entre sí por 1 hora. El aparato se limpió con etanol 10 % entre sesiones y animales para eliminar el estímulo olfativo. Este protocolo fue descrito por Caceres et al. (2009, 2010).

*Sesión de habituación:* Consiste en dos etapas. En primer lugar, se realizó una *sesión de habituación* al aparato de 3 minutos, durante la cual el animal pudo explorar libremente ambos compartimientos. A los pocos segundos de ser ubicadas en el dispositivo, las ratas suelen pasar al compartimiento oscuro, donde permanecen la mayor parte del tiempo, dado que lo consideran el sitio “seguro”. En los casos en los que el animal realizó tres pasajes de un lado al otro - considerando como “pasaje” el movimiento desde el lado iluminado al oscuro y el

retorno al iluminado-, se interrumpió la sesión antes de llegar a los tres minutos. Al finalizar la sesión de habituación, la rata retornó a su caja original, en donde permaneció durante 10 minutos. Posteriormente, se volvió a trasladar y a ubicar en el dispositivo. Una vez que pasó al lado oscuro, se cerró la puerta corrediza bloqueando el paso entre ambos compartimientos y quedando la rata en el lado oscuro durante 10 segundos. Luego, la rata retornó por 1 hora a su jaula original hasta la siguiente sesión.

*Sesión de entrenamiento:* La rata fue ubicada nuevamente en el lado iluminado y una vez que pasó al lado oscuro (al apoyar las 4 patas), recibió un shock eléctrico de 1.2 mA. Luego del shock, el animal fue retirado inmediatamente. Se registró la latencia desde que se lo ubicó en el lado iluminado hasta que ingresó al lado oscuro y recibió el estímulo (Tiempo 1, T1). El animal fue devuelto a su jaula original por 1 hora hasta la siguiente sesión.

*Sesión de retención:* Se realizó 1 hora después para medir memoria de corto plazo. Se ubicó el animal en el lado iluminado y se registró la latencia para ingresar al lado oscuro (Tiempo 2, T2). Cuando la rata no pasó al lado oscuro durante un tiempo máximo de 5 minutos, fue retirada del dispositivo y se dio por concluida la prueba.

#### 4.3.2. Campo Abierto (CA)

Esta prueba permite evaluar una variedad de comportamientos que se producen en respuesta a la exposición a un espacio abierto, novedoso, del cual no se puede escapar debido a las paredes circundantes (Walsh & Cummins, 1976). A partir de la evaluación del desempeño en esta prueba, se pueden obtener medidas de la locomoción, la memoria de habituación, la actividad exploratoria y las conductas relacionadas a la ansiedad, entre otras (Walsh & Cummins, 1976; Vianna et al., 2000; Barros et al., 2006; Standford, 2007). Varios autores han correlacionado la actividad de los roedores en el CA con la funcionalidad del HC (Izquierdo et al., 1992, 1997; Vianna et al., 2000; Daenen et al., 2001; Wright et al., 2004). Una de las tareas de aprendizaje no asociativo más elementales es la habituación conductual a un ambiente novedoso (Vianna et al., 2000; Popovic et



al., 2014). El CA ha sido una prueba útil para este propósito a partir de la inclusión de una segunda exposición al aparato, en la cual se espera encontrar una disminución en determinados parámetros relacionados a la locomoción y la conducta exploratoria, pudiéndose utilizar como índices de la memoria de habituación (Cerbone & Sadile, 1996; Leussis & Bolivar, 2006). El intervalo entre una primera y una segunda exposición puede variar dependiendo de la temporalidad de la memoria que quiere ser evaluada (memoria de corto o largo plazo).

Dispositivo utilizado: El dispositivo consistió en una caja de madera (50cm x 50cm x 45cm) construida “ad hoc”, con la base dividida por líneas negras en 25 cuadrados iguales (Figura 6). El CA fue iluminado con una lámpara de 20 W. Para registrar la actividad de los animales se utilizó una cámara filmadora digital (Handycam DCR-DVD810, Sony) que fue posicionada sobre un trípode.



**Figura 6.** Dispositivo utilizado para la prueba de Campo Abierto.

Procedimiento: Se realizaron dos sesiones de CA, separadas entre sí por 1 hora. En ambas sesiones, se colocó a la rata en el centro del dispositivo y se filmó su actividad durante 5 minutos. En la primera sesión se registró el número de líneas cruzadas (exploración horizontal) y el número elevaciones en dos patas

(exploración vertical). Las elevaciones en dos patas incluyeron el comportamiento de “climbing” (cada vez que la rata se apoyó con sus patas anteriores en la pared) y de “rearing” (cuando elevó sus patas anteriores sin apoyo). En la segunda sesión solo se midió la cantidad de líneas cruzadas. La variación entre el número de líneas cruzadas en la primera y segunda sesión se tomó como medida de la memoria de habituación. Previo a cada sesión el animal fue habituado a la jaula y a la sala de conducta. Antes y después de cada sesión, el CA se limpió con etanol 10 % para eliminar el estímulo olfativo.

#### 4.3.3. Laberinto en Cruz Elevado (LCE)

Esta prueba fue utilizada para cuantificar comportamientos relacionados a la ansiedad y de evaluación de riesgos. Su validez se basa en el conflicto natural que genera en el animal el impulso a explorar un nuevo entorno y la tendencia a evitar un área potencialmente peligrosa (Pellow, et al., 1985). El LCE ha sido clasificado como un modelo de aversión incondicionado dado que genera una respuesta espontánea relacionada a la ansiedad que se puede ver en la preferencia de los roedores por estar en los brazos cerrados en lugar de los abiertos (Carobrez & Bertoglio, 2005). Diversos estudios han reforzado estos postulados correlacionando un aumento de la actividad en el brazo abierto con drogas ansiolíticas y una disminución de la misma con drogas ansiogénicas (Pellow et al., 1985; Handley et al., 1993; Griebel et al., 1994; Lister, 1990).

Por otra parte, en las últimas décadas ha cobrado relevancia la evaluación de otras dimensiones comportamentales fuertemente relacionadas con el miedo y la ansiedad: las respuestas defensivas. El comportamiento defensivo hace referencia a una serie de comportamientos que reducen las posibilidades de que el animal sea dañado (McFarland, 1987). En particular, los comportamientos de evaluación de riesgos han sido estudiados y correlacionados con otros índices de ansiedad en el LCE. Estos comportamientos resultan útiles para obtener información sobre situaciones potencialmente peligrosas y suelen ser ejecutados a lo largo de todo el test (Blanchard & Blanchard, 1989; Roy & Chapillon, 2004; Carobrez & Bertoglio, 2005).

Dispositivo utilizado: El dispositivo consiste en un laberinto construido en madera ubicado a 50cm de altura, con 4 brazos de 10cm x 50cm, dos abiertos y dos cerrados con paredes de 40cm, perpendiculares a los primeros (Figura 7). El LCE fue suavemente iluminado con una luz ubicada a 2 metros de altura. Para registrar la actividad de los animales se utilizó una cámara filmadora digital (Handycam DCR-DVD810, Sony) que fue posicionada sobre un trípode.



**Figura 7.** Dispositivo utilizado para la prueba de Laberinto en Cruz Elevado.

Procedimiento: La rata fue colocada en uno de los brazos cerrados próxima a la intersección, mirando hacia el centro. Se filmó la actividad del animal durante 5 minutos. Se registraron comportamientos relacionados a la ansiedad (latencia a entrar en el brazo abierto y número de entradas al mismo) y la conducta de evaluación de riesgos (número de “Head Dipping”, HD y de “Stretched Attend Postures”, SAP). Se consideró HD cada vez que el animal se detuvo a mover la cabeza por fuera del brazo en donde tenía el resto del cuerpo y las cuatro patas (Mikics, et al., 2005; Kyriakow et al., 2017). El comportamiento de SAP fue registrado cada vez que la rata balanceó su cuerpo hacia adelante y luego se retrajo a la posición original sin avanzar (Mikics, et al., 2005). Previo a la evaluación, el animal fue habituado a la jaula y a la sala de conducta. El laberinto

se limpió con etanol 10 % entre animales para eliminar el estímulo olfativo. Los animales que cayeron del LCE fueron excluidos del estudio.

#### 4.4. Potenciales evocados auditivos

Dado que la exposición al ruido podría generar una pérdida auditiva, utilizamos una técnica para evaluar la función coclear y el grado de cambio de umbral inducido por el ruido. Las respuestas auditivas del tallo cerebral (ABR) son potenciales evocados de sonido generados por circuitos neuronales en las vías auditivas ascendentes y, en consecuencia, requieren de la integridad funcional de las células ciliadas, así como sus neuronas aferentes. Las ABR pueden registrarse de forma no invasiva en diferentes momentos posteriores a la exposición y la comparación de sus cambios de umbral puede proveer información importante sobre el (los) sitio (s) de disfunción.

Procedimiento: Los animales se anestesiaron con ketamina (100 mg/kg, i.p.) y xilazina (20 mg/kg, i.p) y se colocaron en una sala acústica y eléctricamente protegida mantenida a 30°C. El método para medir ABR fue esencialmente como se describe en Kujawa y Liberman (2009) y Maison et al. (2013). Brevemente, los estímulos acústicos se entregaron a través de un sistema compuesto por dos auriculares dinámicos en miniatura utilizados como fuentes de sonido y un micrófono condensador Electret acoplado a una sonda para medir la presión del sonido cerca del tímpano. La generación de estímulos digitales y el procesamiento de respuestas fueron manejados por tarjetas digitales I-O (National Instruments) impulsadas por un software personalizado (LabVIEW). Las ABR se registraron con electrodos de aguja con una referencia de tierra cerca de la cola. Las respuestas auditivas fueron evocadas con *pips* de tono de 5 ms, amplificadas (10.000 ×), filtradas (0.1-3 kHz) y adquiridas en una computadora. El nivel de sonido se elevó en pasos de 5 dB y el 'umbral' se definió como el nivel de SPL más bajo en el que se detectó una onda.

#### 4.5. Determinación de ROS

Los niveles de ROS hipocampales se determinaron mediante el método descrito por Driver et al. (2000). Brevemente, los tejidos se homogeneizaron en hielo con solución de Locke's (dilución 1:200, concentración final: 0,5 mg de tejido/100  $\mu$ l). Los homogenatos fueron colocados en placas de 24 wells (0.45 ml/well) y se dejaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación se añadieron 5  $\mu$ l de diacetato de dicloro-fluoresceína (0,97 mg de DCFH/ml de DMSO; concentración final 10  $\mu$ M) y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Finalmente, se midió la fluorescencia a 485 nm (excitación) y 530 nm (emisión). Se realizó una curva estándar usando diclorofluoresceína oxidada (DCF). Los resultados se calcularon como pmol de DCF/mg de proteína y se expresaron como promedios  $\pm$  SEM. La concentración de proteínas se determinó utilizando el método de Bradford usando gamaglobulina como estándar. Las concentraciones de las diluciones de la curva y las muestras fueron determinadas en un espectrofotómetro.

#### 4.6. Medición de la actividad de catalasa (CAT)

La actividad de CAT se determinó de acuerdo con Beers y Sizer (1952) y Weydert y Cullen (2010). Brevemente, se prepararon homogenatos de tejido 1:10 (10mg/100  $\mu$ l) en buffer fosfato 50 mM PH 7.4 utilizando un sonicador. Se colocaron 50  $\mu$ l de homogenato en tubos de vidrio a los cuales se les agregó 4 ml de buffer fosfato a cada muestra. Se mezcló por inversión y se dividió cada muestra en dos partes. A una de las mitades se le agregó 1 ml de buffer fosfato (blanco de muestra o de referencia) y a la otra se le agregó 1 ml de solución de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) 0,06 M, se colocó en una cubeta de cuarzo y se midió inmediatamente en el espectrofotómetro, registrándose la absorbancia cada 15 segundos por un total de 150 segundos a una longitud de onda de 240 nm. Se realizó una curva estándar de CAT en buffer fosfato y se realizaron blancos de buffer fosfato (3 ml de buffer fosfato) y  $H_2O_2$  (2 ml de buffer fosfato y 1 ml de  $H_2O_2$ ). Los resultados se calcularon como unidades de CAT/mg de proteína y se

expresaron como promedios  $\pm$  SEM. La concentración de proteínas se determinó utilizando el método de Bradford, como se describió en el ítem anterior.

#### 4.7. Evaluación histológica

Fijación: La perfusión intracardiaca y las secciones del hipocampo coronal se realizaron como se describió anteriormente por Saraceno et al. (2016). Los animales fueron anestesiados con ketamina (100 mg/kg, i.p.) y xilazina (20 mg/kg, i.p.), y se perfundieron intracardiamente con paraformaldehído al 4% en tampón de fosfato 0,1 M, pH 7,4. Se extrajeron los cerebros, posteriormente se fijaron en la misma solución de fijación durante 2 horas a temperatura ambiente y luego se sumergieron durante la noche a 4°C en buffer fosfato 0,1 M, pH 7,4. Se obtuvieron secciones de hipocampo coronal (grosor 50  $\mu$ m) usando un vibrátomo (VT 1000 S, Leyca Microsystems, Wetzlar, Alemania).

Inmunomarcación: La inmunohistoquímica se realizó en secciones de flotación libre con agitación moderada. La peroxidasa endógena se inactivó (3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 70% de metanol, 30% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 vol) y la unión inespecífica se bloqueó usando 0,3% de suero de cabra normal. Se incubaron secciones flotantes durante 48 horas a 4°C con un anticuerpo anti-proteína fibrilar ácida glial (GFAP; IgG de conejo monoclonal, 1:200, Cell Marque, Sigma-Aldrich). A continuación, las secciones se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (IgG anti-ratón biotinilada, 1: 500, Vector; IgG anti-conejo biotinilada, 1: 500, Vector). La amplificación se realizó usando un complejo de peroxidasa biotinilado con avidina (1: 500, Dako) en PBS durante 1 hora, seguido de lavado en PBS antes del desarrollo del cromógeno (DAB; Cell Marque, Sigma-Aldrich Company). Se obtuvieron imágenes con un microscopio óptico Leyca.

#### 4.8. Western Blot

Extracción: Los animales fueron sacrificados con guillotina para la extracción del HC. Se realizó la disección del HC entero que fue guardado en un freezer -80 °C hasta su utilización.

Homogenatos: Las muestras fueron sonicadas en buffer lisis (Hepes 25 mM, EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, DTT 1 mM, Leupeptina 1 µM, PMSF 0.2 mM) en una concentración 1:2 (10 mg/20 µl) para luego ser centrifugadas para la extracción del sobrenadante. Para determinar la concentración de proteínas de cada muestra se siguió el procedimiento de Bradford, utilizando gamaglobulina como estándar. Las concentraciones de las diluciones de la curva y las muestras fueron determinadas con un espectrofotómetro. Todas las diluciones se hicieron por duplicado. Finalmente, de acuerdo a la concentración de proteínas determinada, las muestras de HC fueron diluidas con solución de buffer muestra 6X (en 10ml: SDS 1 g, glicerol 3 ml, b-mercaptoetanol 600 µl, azul de bromofenol 1.2 mg, 7 ml Tris-HCl, pH 6.8), de manera de tener 10µg de proteína//µl. Posteriormente, se hirvieron por 3 minutos y se guardaron en un freezer a -20 °C hasta su utilización.

Pre-tratamiento de los homogenatos: Dado que Trx1 y Trx2 pueden encontrarse polimerizados y/o en distintos estados de oxidación, se realizó un tratamiento previo al sembrado para conseguir la reducción de los puentes disulfuro. Las muestras fueron suplementadas con 1 µl de DTT 1 M por cada 10 µl de muestra e incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego a 94 °C durante 10 minutos.

Técnica de Western Blot: Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 14% usando el dispositivo Transblot Mini II (Bio-Rad) a 75-100 V (voltaje constante) a 4 °C por aproximadamente 2 horas. Posteriormente fueron transferidas a membranas de PVDF (Bio-Rad Laboratories,

USA), con un voltaje de 30 V durante 16 horas (overnight a 4 °C ). Las proteínas fueron visualizadas con una tinción reversible de solución de Ponceau-S (Sigma, Co., MO, USA) y luego se procedió a lavar con buffer Tris (TBS). Los sitios de unión inespecífica fueron bloqueados con buffer de bloqueo (5% leche descremada, 1% BSA) durante 1 hora. Las membranas fueron incubadas overnight a 4 °C con el anticuerpo primario anti-Trx1 (1:1000, gentileza de Christopher Lillig, Universidad de Greifswald, Alemania), anti-Trx2 (1:1000, gentileza de Christopher Lillig, Universidad de Greifswald, Alemania), anti-EAAT-1 (1:500; Wuhan Fine Biotech Co., Ltd., Wuhan City, Hubei, China) o anti-GAD 65/67 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). El anticuerpo anti-GAPDH (1:5000, Santa Cruz Biotechnology) fue utilizado como control de carga.

Posteriormente, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario IgG-HRP anti-conejo conjugado (1:5000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) por 2 horas a temperatura ambiente, con agitación. La densidad óptica (DO) de las bandas fue determinada cuantitativamente por densitometría luego del agregado de una solución de luminol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, utilizando el procesador GE Health Care Image Quant para la cuantificación de Trx1 y Trx2. El revelado de EAAT-1 y GAD<sub>65-67</sub> se realizó en cuarto oscuro, utilizando placas (AGFA), revelador TD-3 y fijador TD-4 marca Romek. Para el análisis de las fotos se utilizó el software Image J (versión 1.43u, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

#### 4.9. Enriquecimiento ambiental con ejercitación física

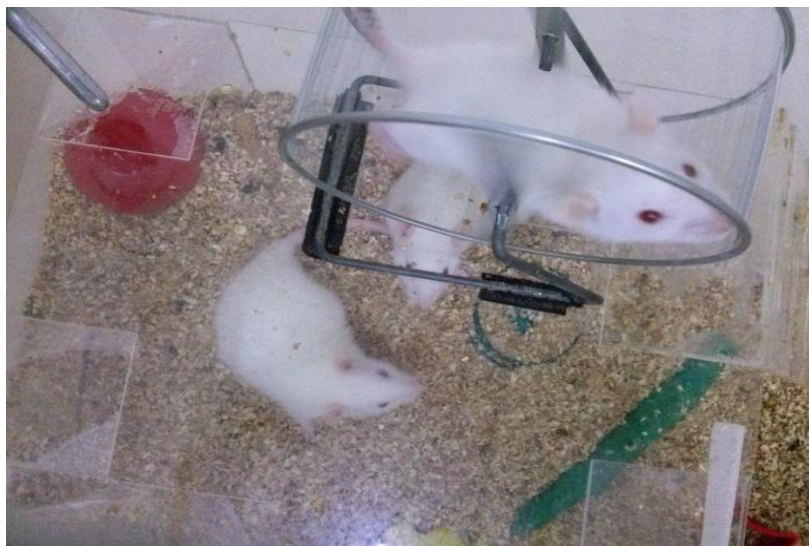
Las jaulas de AE proveen un ambiente de mayor estimulación táctil, motora, visual, cognitiva y social que las jaulas estándar o normales. El AE ha sido utilizado como una estrategia de neuroprotección no farmacológica (Petrosini et al., 2009) y ha mostrado ser eficaz para prevenir o revertir diferentes alteraciones provocadas por daños al SNC (Lorez Arnaiz et al., 2006).



Jaulas de AE: El AE consiste en jaulas de dimensiones mayores a la estándar (60cm x50cm x40cm), en las cuales se pueden alojar grupos de 3-5 animales. Cada jaula cuenta con dos pisos (50cm x 20cm y 20cm x 30cm) y está equipada con tubos cilíndricos de PVC, dos rampas que conectan el piso con el primer nivel, un túnel que conecta el piso con el segundo nivel, un comedero, bloques encastrables (que pueden ser utilizados como madriguera), varios objetos diferentes que se renuevan día por medio y 1 rueda para realizar actividad física (Figuras 8, 9 y 10). Los animales permanecieron en las jaulas de AE por 1 o 2 semanas luego del destete. Cada dos días se realizó la limpieza de las jaulas, renovando además algunos de sus objetos, cambiando las salidas del túnel y modificando la ubicación de los bloques encastrables. Cada vez que se cambió el lecho, se dejó una pequeña cantidad de anillos de azúcar como estimulación gustativa (FrootLoops® o Granix®).



**Figura 8.** AE visto desde arriba. Durante el primer año, el lecho fue de viruta pero posteriormente fue reemplazado por marlo de choclo.



**Figura 9.** Primer piso del AE. Una rata utilizando la rueda.



**Figura 10.** Túnel que conecta el piso con la segunda plataforma.

#### 4.10. Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados, se realizó una prueba de normalidad para cada grupo (prueba KS). La existencia de posibles diferencias significativas entre los grupos se evaluó mediante una prueba de ANOVA de una, dos o tres vías con comparaciones post hoc (LSD), utilizando el software Infostat/L. Cuando las

interacciones fueron significativas, se realizó un análisis de efecto simple mediante ANOVA de una o dos vías.

Los resultados se expresaron como promedios  $\pm$  SEM y los gráficos se realizaron con el software Prism Graphpad. Una probabilidad  $p < 0.05$  fue aceptada como significativa.

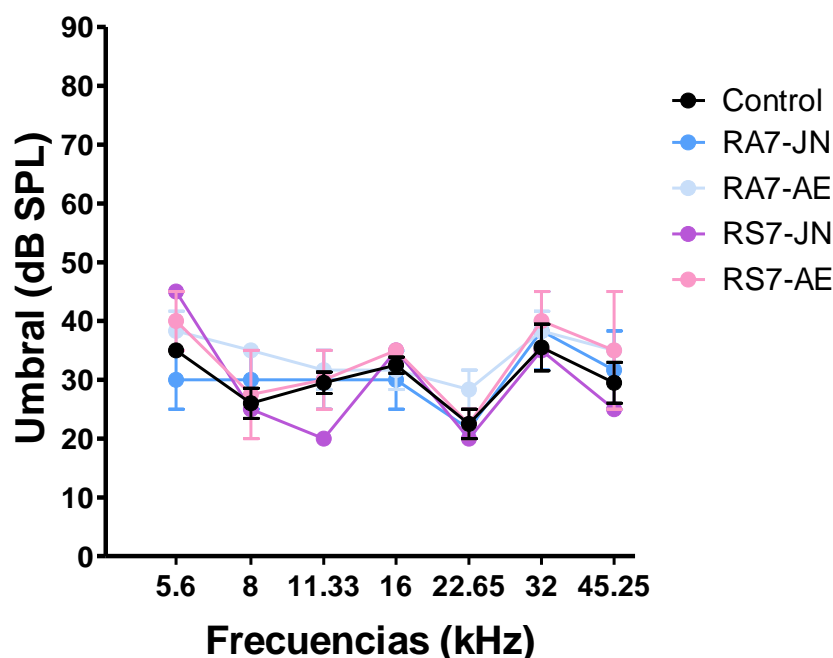
A faint, stylized illustration of neurons with cell bodies and branching processes, serving as a background for the section header.

## **5. Resultados**

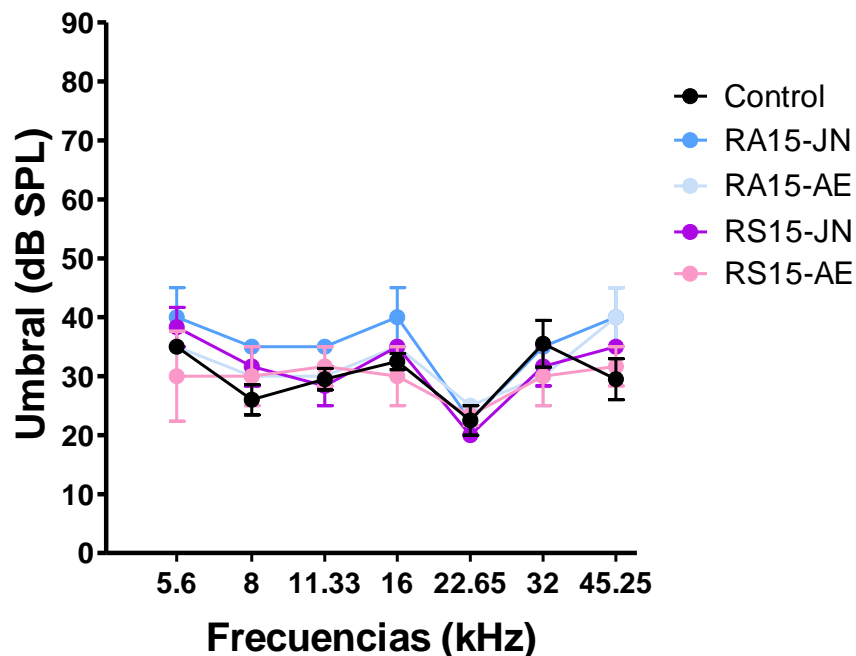
## **5. Resultados**

### **5.1. Potenciales evocados auditivos.**

La función auditiva de los animales se evaluó mediante la prueba de potenciales evocados para la determinación del umbral auditivo. No se hallaron diferencias significativas entre los animales expuestos a R7 y los animales controles, tanto en los esquemas de exposición a RA como a RS, alojados en JN o EA (Figura 11a, ANOVA de dos vías,  $F_{4,62}= 1,58$ , NS). Por otra parte, tampoco se encontraron diferencias significativas entre las ratas expuestas a R15 y sus respectivos controles en ninguno de los esquemas de exposición y tipo de alojamiento (Figura 11b, ANOVA de dos vías,  $F_{4,68}= 2,41$ , NS). En todos los grupos, el umbral osciló entre los 20 y los 45 dB SPL para todas las frecuencias evaluadas.



**Figura 11a.** Respuestas auditivas del tallo cerebral (ABR). Control: animales no expuestos al ruido; RA7-JN: Ruido agudo a los 7 DPN, jaula normal; RA7-AE: Ruido agudo a los 7 DPN, ambiente enriquecido; RS7-JN: Ruido sub-agudo a los 7 DPN, jaula normal; RS7-AE: Ruido sub-agudo a los 7 DPN, ambiente enriquecido. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM de las ABR,  $n=3$  para cada grupo.



**Figura 11b.** Respuestas auditivas del tallo cerebral (ABR). Control: animales no expuestos al ruido; RA15-JN: Ruido agudo a los 15 DPN, jaula normal; RA15-AE: Ruido agudo a los 15 DPN, ambiente enriquecido; RS15-JN: Ruido sub-agudo a los 15 DPN, jaula normal; RS15-AE: Ruido sub-agudo a los 15 DPN, ambiente enriquecido. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM de las ABR,  $n=3$  para cada grupo.

## **5.2. Resultados de pruebas conductuales.**

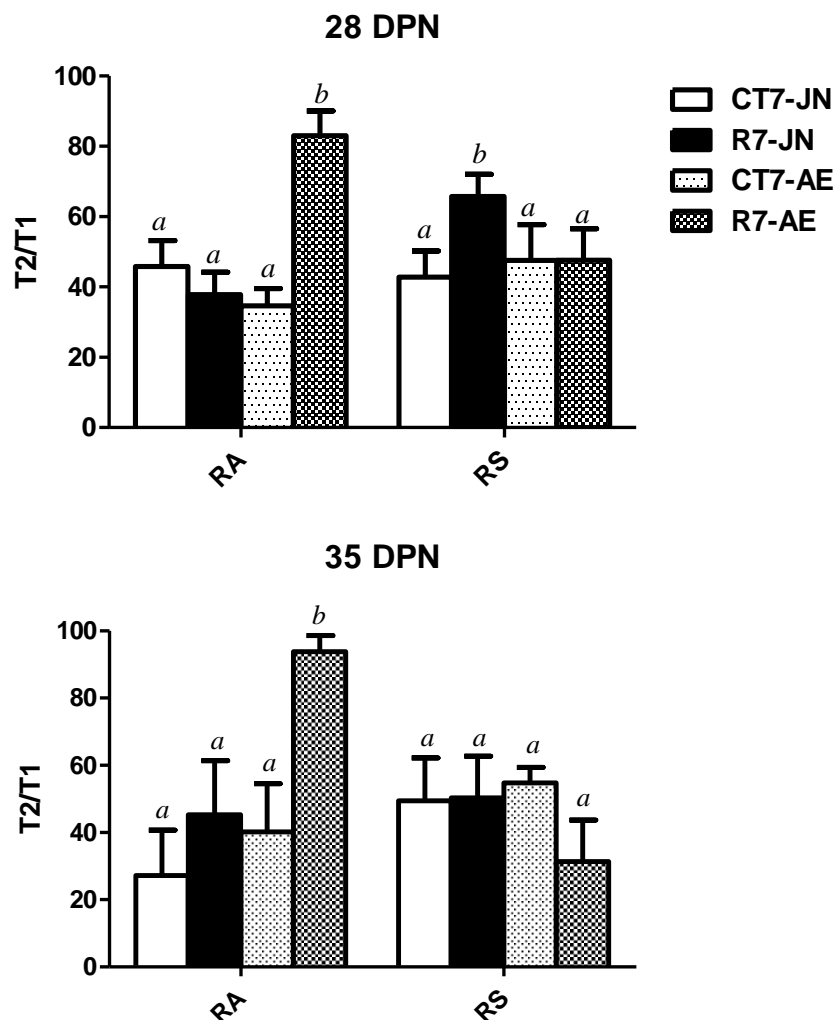
### **5.2.1. Evitación Inhibitoria (EI)**

En este test,  $T2 / T1$  se calcula como la relación entre los tiempos medidos en la sesión de retención y la de entrenamiento y fue considerado un índice de memoria asociativa.

La Figura 12a muestra un efecto principal significativo en la relación  $T2 / T1$  en ratas expuestas en el DPN 7 y evaluadas a los 28 DPN (ANOVA de tres vías,  $F_{7,50} = 5,49$ ,  $p < 0,01$ ). Aunque no hubo diferencias significativas entre los animales expuestos al ruido y alojados en condiciones estándar (JN) según el esquema RA y sus respectivos controles, se observó un aumento significativo cuando el alojamiento fue AE (entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,50} = 9,92$ ,  $p < 0,01$ ; alojamiento (CT o AE), NS. Dentro de los factores: esquema de exposición

(RA o RS), NS). En cambio, se observó un aumento en esta relación después de exposiciones repetidas al ruido en animales alojados en JN, sin observarse cambios en los animales alojados en AE cuando se compararon con las ratas controles correspondientes. Dado que algunas interacciones fueron significativas (entre alojamiento y esquema:  $F_{1,50} = 5,50$ ,  $p < 0,05$ ; entre exposición, esquema y alojamiento:  $F_{1,50} = 20,32$ ,  $p < 0,01$ ), se realizó un análisis de efecto simple (JN: ANOVA de dos vías,  $F_{3,24} = 5,36$ ,  $p < 0,01$ . Entre factores: exposición (control o ruido), NS. Dentro del factor: esquema (RA o RS), NS. AE: ANOVA de dos vías,  $F_{3,25} = 6,85$ ,  $p < 0,01$ . Entre factor: exposición (control o ruido),  $F_{1,25} = 7,71$ ,  $p < 0,01$ . Dentro del factor: esquema (RA o RS), NS). Dado que la interacción entre exposición y esquema fue también significativa, tanto en JN como en AE (JN:  $F_{1,24} = 10,43$ ,  $p < 0,01$ ; AE:  $F_{1,25} = 10,36$ ,  $p < 0,01$ ), se realizaron análisis de efecto simple en ambos grupos. Las comparaciones post hoc mostraron un aumento significativo en la relación T2 / T1 de los animales expuestos a RS y alojados en JN en comparación con su control ( $p < 0,05$ ) y en animales expuestos a RA alojados en AE en comparación con su control ( $p < 0,05$ ).

En animales evaluados a los 35 DPN no se encontró un efecto principal significativo en la relación T2 / T1 en ratas expuestas en el DPN 7 (Figura 12a, ANOVA de tres vías,  $F_{7,41} = 1,76$ , NS). Sin embargo, dado que se encontró una interacción significativa entre alojamiento y esquema ( $F_{7,41} = 5,20$ ,  $p < 0,05$ ), se realizó un análisis de efecto simple (RA: ANOVA de dos vías,  $F_{3,21} = 2,94$ ,  $p < 0,05$ . Entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,21} = 2,96$ , NS. Dentro del factor alojamiento (JN o AE),  $F_{1,21} = 4,91$ ,  $p < 0,05$ ; RS,  $F_{3,19} = 0,43$ , NS). Los resultados mostraron un aumento significativo en ratas expuestas a los 7 DPN de acuerdo a RA alojadas en AE y evaluadas a los 35 DPN cuando se compararon con sus respectivos controles (comparaciones post hoc: control vs ruido: RA: JN, NS; AE,  $p < 0,05$ ; RS: JN y AE, NS).



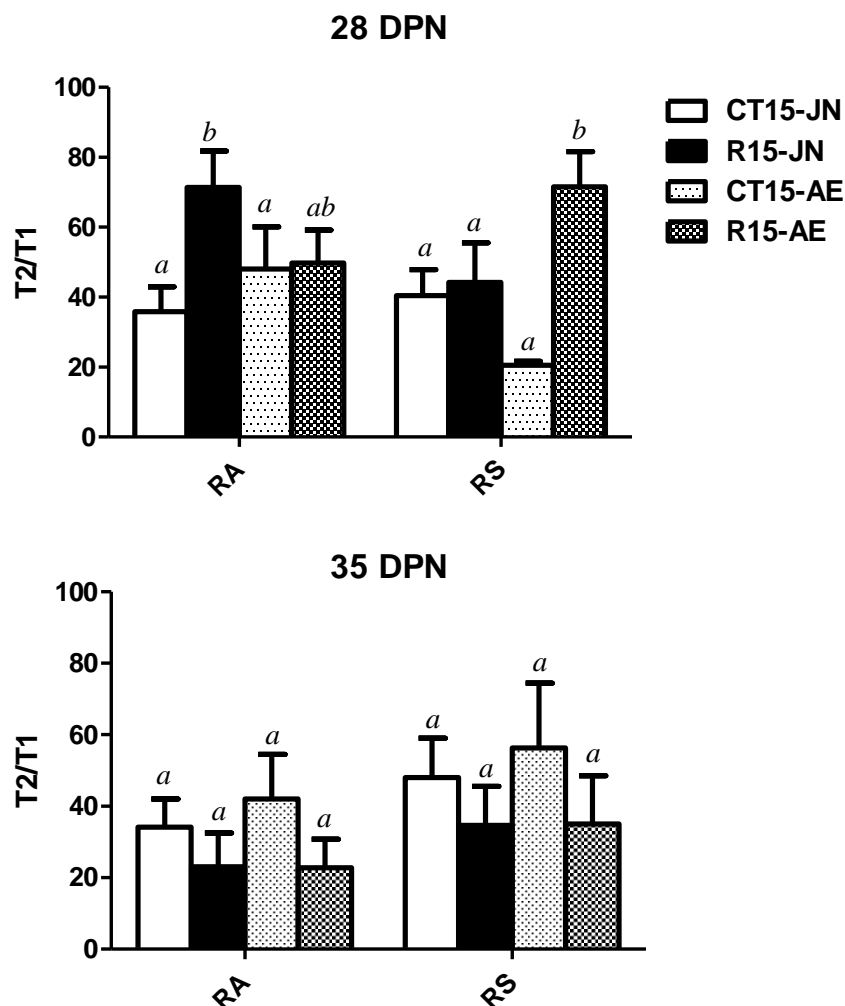
**Figura 12a.** Cociente de la latencia para ingresar al compartimiento oscuro (en segundos) en la sesión de retención respecto a la sesión de entrenamiento en la tarea EI. Gráfico superior: animales evaluados a los 28 DPN; Gráfico inferior: animales evaluados a los 35 DPN. CT7-JN: Control a los 7 DPN, jaula normal; R7-JN: Ruido a los 7 DPN, jaula normal; CT7-AE: Control a los 7 DPN, ambiente enriquecido; R7-AE: Ruido a los 7 DPN, ambiente enriquecido; RA: Ruido agudo; RS: Ruido sub-crónico. Letras distintas (a,b) simbolizan diferencias significativas con  $p < 0.05$ . Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM del cociente de la latencia para ingresar al compartimiento oscuro (en segundos) en la sesión de retención respecto a la sesión de entrenamiento en la tarea EI.

Por otra parte, la exposición al ruido a los 15 DPN indujo un efecto principal significativo en la relación  $T2 / T1$  cuando se evaluó a los 28 DPN (Figura 12b; ANOVA de tres vías,  $F_{7,53} = 2,79$ ,  $p < 0,01$ ). Aunque se observó un aumento significativo en los animales alojados en JN expuestos al ruido una única vez cuando se comparó con el control, no se produjeron cambios en este parámetro cuando los animales se expusieron cinco días consecutivos. El alojamiento en un



AE indujo un aumento significativo solo cuando las ratas estuvieron expuestas durante 5 días consecutivos (RS), sin cambios en ratas expuestas a RA (Entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,53}=7,84$ ,  $p<0,01$ ; alojamiento (JN o AE), NS. Dentro de los factores: esquema (RA o RS), NS). Dado que la interacción entre exposición, alojamiento y esquema fue significativa ( $F_{1,53}=7,89$ ,  $p<0,01$ ), se realizó un análisis de efecto simple (JN: ANOVA de dos vías,  $F_{3,26}=3,30$ ,  $p<0,05$ . Entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,26}=2,42$ , NS. Dentro del factor: Esquema (RA o RS), NS. AE: ANOVA de dos vías,  $F_{3,26}=3,20$ ,  $p<0,05$ . Entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,26}=5,62$ ,  $p<0,05$ . Dentro del factor: esquema (RA o RS), NS. Comparaciones post hoc: control vs ruido, AE: RA, NS; RS,  $p<0,05$ ). Dado que la interacción entre la exposición y el esquema fue significativa en animales de JN ( $F_{1,26}=4,16$ ,  $p<0,05$ ), se realizó un análisis de efecto simple. Las comparaciones post-hoc mostraron un aumento significativo en la relación T2 / T1 en los animales expuestos a RA y alojados en JN ( $p<0,05$ ), sin observarse cambios en los animales RS.

Finalmente, no se observaron diferencias significativas entre los animales expuestos al ruido y el grupo control correspondiente para los diferentes esquemas de exposición, tanto en condiciones de alojamiento en JN como en AE, cuando se evaluaron a los 35 DPN (figura 12b, ANOVA de tres vías,  $F_{3,46}=1,43$ , NS).



**Figura 12b.** Cociente de la latencia para ingresar al compartimiento oscuro (en segundos) en la sesión de retención respecto a la sesión de entrenamiento en la tarea EI. Gráfico superior: animales evaluados a los 28 DPN; gráfico inferior: animales evaluados a los 35 DPN. CT15-JN: Control a los 15 DPN, jaula normal; R15-JN: Ruido a los 15 DPN, jaula normal; CT15-AE: Control a los 15 DPN, ambiente enriquecido; R15-AE: Ruido a los 15 DPN, ambiente enriquecido; RA: Ruido agudo; RS: Ruido sub-crónico. Letras distintas (a,b) simbolizan diferencias significativas  $p < 0.05$ . Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM del cociente de la latencia para ingresar al compartimiento oscuro (en segundos) en la sesión de retención respecto a la sesión de entrenamiento en la tarea EI.

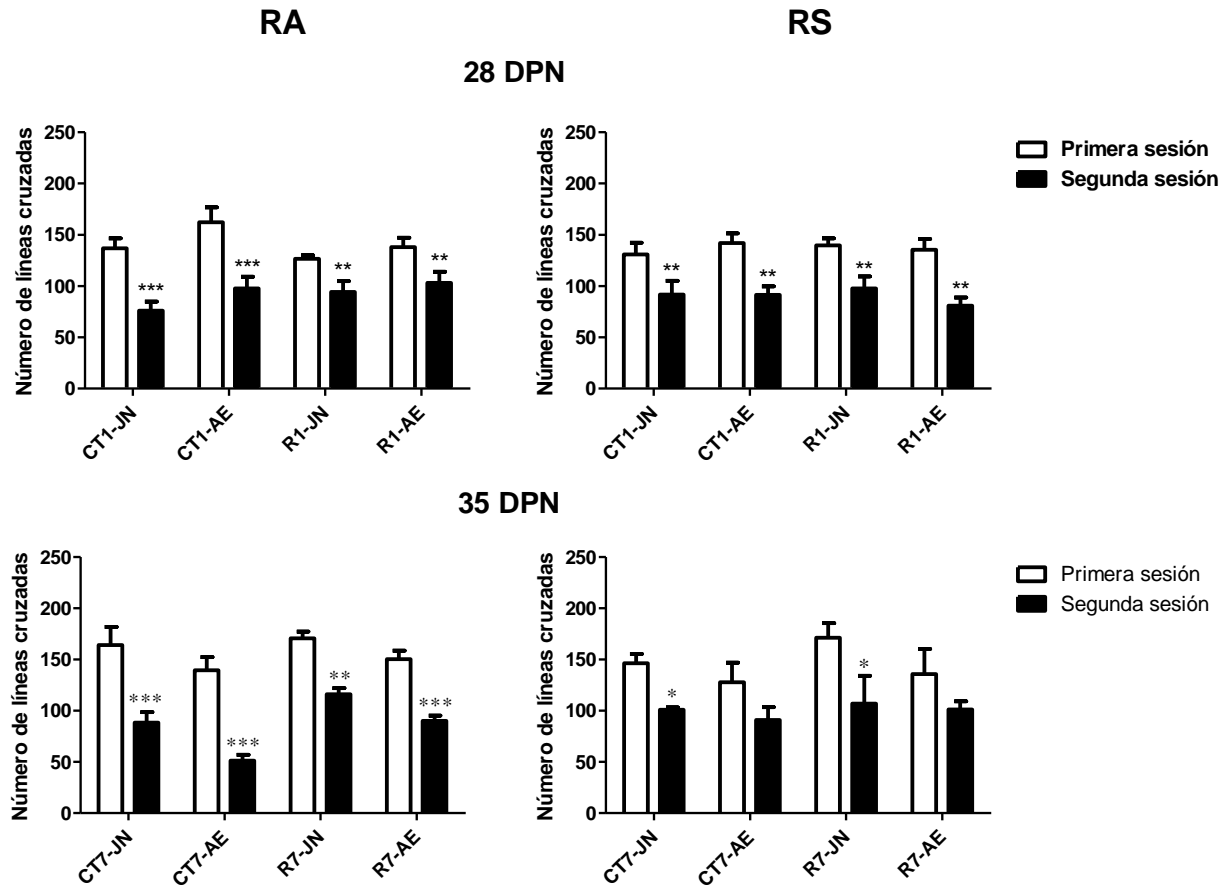
### 5.2.2. Campo Abierto (CA).

a) El número de líneas cruzadas en el CA en dos sesiones de 5 minutos, separadas por un intervalo de 1 hora se consideró un índice de habituación a corto plazo a un nuevo entorno.

Los datos muestran que la exposición a R7, según los esquemas RA y RS, indujo una disminución en el número de líneas cruzadas en la segunda sesión del

CA en comparación con la primera sesión, tanto en condiciones de alojamiento normales como enriquecidas, que resultaron similares a lo que se observó en animales controles de 28 DPN (Figura 13a, RA: ANOVA de tres vías,  $F_{7,65} = 7,77$ ,  $p < 0,01$ . Entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,65} = 0,22$ , NS; alojamiento (JN o AE),  $F_{1,65} = 5,4$ ,  $p < 0,05$ . Dentro del factor: sesión (primera o segunda)  $F_{1,65} = 43,88$ ,  $p < 0,01$ . Comparaciones post hoc: primera vs segunda sesión: todos los grupos,  $p < 0,01$ . Figura 13a, RS: ANOVA de tres vías,  $F_{7,67} = 6,29$ ,  $p < 0,01$ . Entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,67} = 0,04$ , NS; alojamiento (JN o AE),  $F_{1,67} = 0,23$ , NS. Dentro del factor: sesión (primera o segunda)  $F_{1,67} = 41,79$ ,  $p < 0,01$ . Comparaciones post hoc: primera vs segunda sesión: todos los grupos,  $p < 0,01$ ).

Por otro lado, cuando se analizó este parámetro en animales de 35 DPN, se halló una disminución en el número de líneas cruzadas en la segunda sesión del CA en comparación con la primera sesión, en animales expuestos a RA, tanto en condiciones normales como enriquecidas, que resultaron similares a lo que se observó en animales controles de 28 DPN (Figura 13a, RA: ANOVA de tres vías,  $F_{7,40} = 14,65$ ,  $p < 0,01$ . Entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,40} = 3,81$ , NS; alojamiento (JN vs AE),  $F_{1,40} = 8,57$ ,  $p < 0,01$ . Dentro del factor: sesión (primera o segunda)  $F_{1,40} = 86,17$ ,  $p < 0,01$ . Comparaciones post hoc: primera vs segunda sesión: todos los grupos,  $p < 0,01$ ). Cuando los animales fueron expuestos a RS, se hallaron diferencias significativas entre las líneas cruzadas de la primera y segunda sesión solo cuando se alojaron en JN, sin encontrarse diferencias en los animales alojados en AE (Figura 13a, RS: ANOVA de tres vías,  $F_{7,29} = 2,70$ ,  $p < 0,05$ . Entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,29} = 0,91$ , NS; alojamiento (JN o AE),  $F_{1,29} = 1,14$ , NS. Dentro del factor: sesión (primera o segunda)  $F_{1,29} = 16,27$ ,  $p < 0,01$ . Comparaciones post hoc: primera vs segunda sesión: JN (control y ruido),  $p < 0,05$ ; AE (control y ruido), NS).



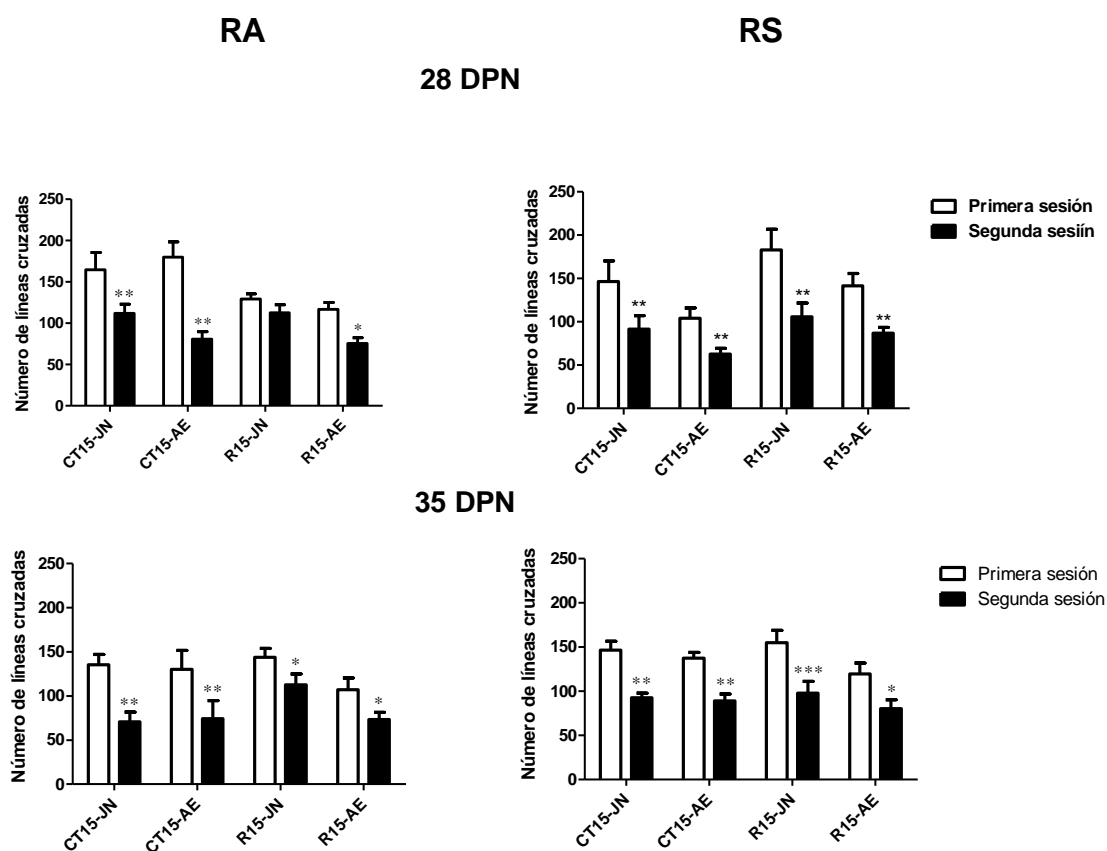
**Figura 13a.** Número de líneas cruzadas en la primera y la segunda sesión en CA en animales expuestos al ruido a los 7 DPN. Gráficos superiores: Animales de 28 DPN; Gráficos inferiores: Animales de 35 DPN. Izquierda: RA; derecha: RS. CT7-JN: Control a los 7 DPN, jaula normal; R7-JN: Ruido a los 7 DPN, jaula normal; CT7-AE: Control a los 7 DPN, ambiente enriquecido; R7-AE: Ruido a los 7 DPN, ambiente enriquecido; JN: Jaula normal; AE: Ambiente enriquecido. \*, \*\*,  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  cuando se compara con la primera sesión. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM del número de líneas cruzadas en la primera y la segunda sesión en CA.

Por otra parte, la mayoría de los grupos mostraron una disminución significativa en el número de líneas cruzadas en la segunda sesión del OF cuando la exposición se llevó a cabo a los DPN 15 de acuerdo al esquema RA y la evaluación se realizó a los 28 DPN (Figura 13b, RA: ANOVA de tres vías,  $F_{7,47} = 9,65$ ,  $p < 0,01$  Entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,47} = 9,49$ ,  $p < 0,01$ ; alojamiento (JN o AE),  $F_{1,47} = 3,67$ , NS. Dentro del factor: sesión (primera o segunda)  $F_{1,47} = 38,91$ ,  $p < 0,01$ ). Dado que la interacción entre exposición y sesión fue significativa ( $F_{1,47} = 10,14$ ,  $p < 0,01$ ), se realizó un análisis de efecto simple

(Figura 13b, Control: ANOVA de dos vías,  $F_{3,21}= 9,34$ ,  $p < 0,01$ . Ruido: ANOVA de dos vías,  $F_{3,25}=8,21$ ,  $p < 0,01$ ). Los resultados muestran que mientras se observaron diferencias significativas entre las líneas cruzadas en la primera y la segunda sesión en la mayoría de los grupos, no se observaron diferencias significativas en los animales expuestos a RA a los 15 DPN y alojados en condiciones de JN (comparaciones post hoc: primera sesión vs segunda sesión, control: JN y AE,  $p < 0,01$ ; ruido: JN, NS; AE,  $p < 0,05$ ). Finalmente, cuando se evaluaron los animales expuestos a los 15 DPN de acuerdo al esquema RS, se observaron diferencias significativas entre las líneas cruzadas de la primera y segunda sesión en todos los grupos (Figura 13b, RS: ANOVA de tres vías,  $F_{7,59}= 5,81$ ,  $p < 0,01$ . Entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,59}= 5,68$ ,  $p < 0,05$ ; alojamiento (JN o AE),  $F_{1,59}= 5,97$ ,  $p < 0,05$ . Dentro del factor: sesión (primera o segunda),  $F_{1,59}= 26,81$ ,  $p < 0,01$ . Comparaciones post hoc: primera vs segunda sesión: todos los grupos,  $p < 0,01$ ).

Por otro lado, cuando se analizó este parámetro en animales de 35 DPN expuestos a los 15 DPN de acuerdo al esquema RA, se encontró también un efecto principal significativo (Figura 13b, ANOVA de tres vías,  $F_{7,49}= 5,85$ ,  $p < 0,01$ . Entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,49}= 0,91$ , NS; alojamiento (JN o AE),  $F_{1,49}= 4,74$ ,  $p < 0,05$ . Dentro del factor: sesión (primera o segunda),  $F_{1,49}= 23,92$ ,  $p < 0,01$ ). Dado que se detectó una interacción significativa entre exposición y alojamiento en ratas expuestas de acuerdo al esquema RA ( $F_{1,49}= 4,46$ ,  $p < 0,05$ ), se realizó un análisis de efecto simple (Control: ANOVA de dos vías,  $F_{3,21}= 5,80$ ,  $p < 0,01$ . Entre factores: alojamiento (JN o AE),  $F_{1,21}= 3,80$ , NS. Dentro del factor: sesión (primera o segunda),  $F_{1,21}= 17,30$ ,  $p < 0,01$ . Comparaciones post hoc: primera vs segunda sesión: Todos los grupos,  $p < 0,01$ . Ruido:  $F_{3,23}= 7,90$ ,  $p < 0,01$ . Entre factores: alojamiento (JN o AE),  $F_{1,23}= 13,20$ , NS. Dentro del factor: sesión (primera o segunda),  $F_{1,23}= 10,33$ ,  $p < 0,01$ . Comparaciones post hoc: JN:  $p < 0,01$ ; AE,  $p < 0,05$ ). Cuando se evaluaron animales expuestos de acuerdo a RS, se encontró también un efecto significativo principal (ANOVA de tres vías,  $F_{7,41}= 6,12$ ,  $p < 0,01$ . Entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,41}= 0,01$ , NS; alojamiento (JN o AE),  $F_{1,41}= 4,43$ ,  $p < 0,05$ . Dentro del factor: sesión (primera o segunda)

$F_{1,41} = 36,33$ ,  $p < 0,01$ ). Los resultados mostraron una disminución en el número de líneas cruzadas en la segunda sesión del CA en comparación con la primera sesión en ambos esquemas de exposición, tanto en condiciones de alojamiento normales como enriquecidas (Comparaciones post hoc: primera vs segunda sesión: Control (JN y AE),  $p < 0,01$ ; Ruido (JN y AE):  $p < 0,05$ ).



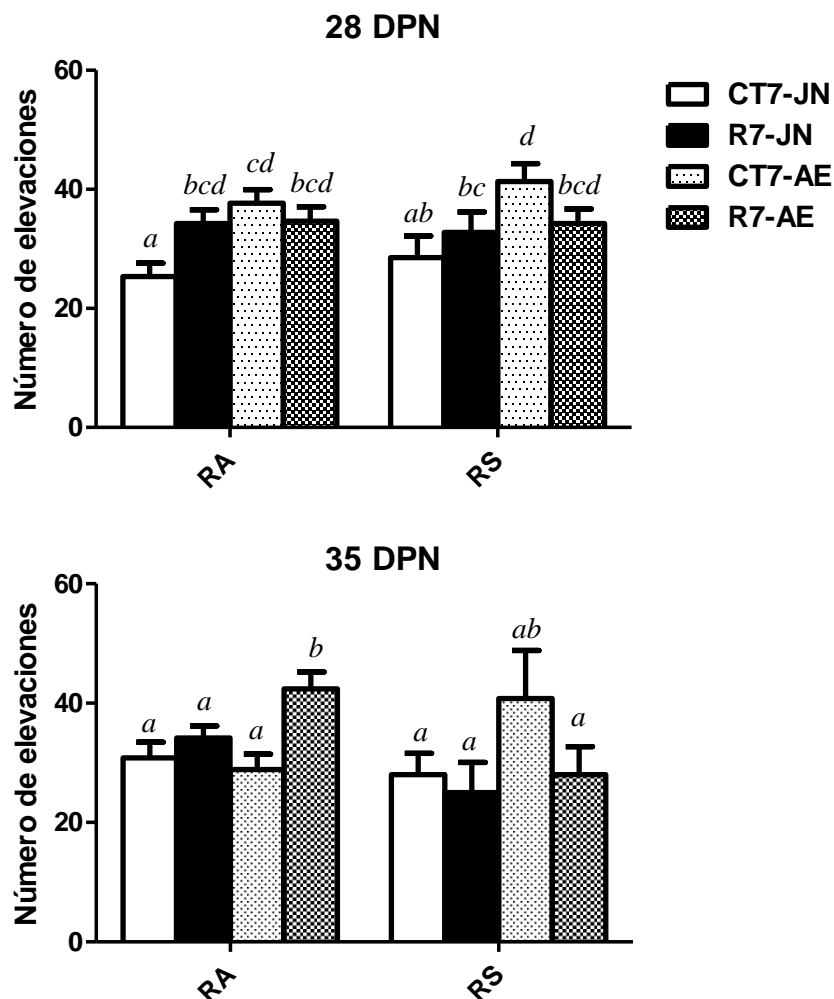
**Figura 13b.** Número de líneas cruzadas en la primera y la segunda sesión en CA en animales expuestos al ruido a los 15 DPN. Gráficos superiores: Animales de 28 DPN; Gráficos inferiores: Animales de 35 DPN. Izquierda: RA; derecha: RS. CT15-JN: Control a los 15 DPN, jaula normal; R15-JN: Ruido a los 15 DPN, jaula normal; CT15-AE: Control a los 15 DPN, ambiente enriquecido; R15-AE: Ruido a los 15 DPN, ambiente enriquecido; JN: Jaula normal; AE: Ambiente enriquecido. \*, \*\*,  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  cuando se compara con la primera sesión. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM del número de líneas cruzadas en la primera y la segunda sesión en CA.

b) El número de elevaciones (es decir, la suma de “rearing” y “climbing”) realizadas en la primera sesión de la tarea CA se consideró como un índice de actividad exploratoria.

La figura 13c muestra un efecto significativo principal en este parámetro (ANOVA de tres vías,  $F_{7,85} = 3,42$ ,  $p < 0,01$ ; Entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,85} = 0,57$ , NS; alojamiento (JN o AE),  $F = 13,08$ ,  $p < 0,01$ ; dentro de los factores: esquema de exposición (RA o RS)  $F_{1,85} = 0,55$ , NS). Dado que la interacción entre la exposición y el alojamiento fue significativa ( $F_{1,85} = 8,43$ ,  $p < 0,01$ ), se realizó un análisis de efecto simple (JN: ANOVA de dos vías,  $F_{3,46} = 2,09$ , NS. Entre factores: esquema, (RA o RS), NS. Dentro del factor: exposición (control o ruido),  $p < 0,05$ . AE: ANOVA de dos vías,  $F_{3,38} = 1,53$ , NS. Entre factores: esquema, (RA o RS), NS. Dentro del factor: exposición (control o ruido), NS). Se puede observar un aumento significativo en este parámetro en los animales expuestos a los 7 DPN de acuerdo al esquema RA y evaluados a los 28 DPN en comparación con los animales controles, cuando los animales se alojaron en JN (comparaciones post hoc: control vs ruido: RA,  $p < 0,05$ ; RS, NS). En cambio, los animales que se alojaron en AE luego de la exposición al ruido no presentaron cambios en este comportamiento. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la actividad exploratoria de los animales expuestos al ruido durante cinco días consecutivos en ninguna de las condiciones de alojamiento.

Por otra parte, no se observó un efecto principal significativo en el número de elevaciones cuando estos animales fueron evaluados a los 35 DPN (Figura 13c, ANOVA de tres vías,  $F_{7,58} = 2,05$ , NS). Dado que se encontró una interacción significativa entre exposición y esquema ( $F_{1,58} = 9,38$ ,  $p < 0,01$ ), se realizó un análisis de efecto simple (RA: ANOVA de dos vías,  $F_{3,37} = 4,75$ ,  $p < 0,01$ . Entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,37} = 8,60$ ,  $p < 0,01$ . Dentro del factor: alojamiento (JN o AE),  $F_{1,37} = 1,76$ , NS. RS: ANOVA de dos vías,  $F_{3,20} = 1,09$ , NS). Los resultados mostraron que aunque no se indujeron cambios en la actividad exploratoria de los animales expuestos a RS para ninguna de las condiciones de alojamiento, se produjo un aumento significativo en este parámetro solo en

animales de 7 DPN expuestos de acuerdo a RA y alojados en AE (comparaciones post hoc: control vs ruido: RA: JN, NS; AE,  $p < 0,05$ ; RS: JN y AE, NS). .



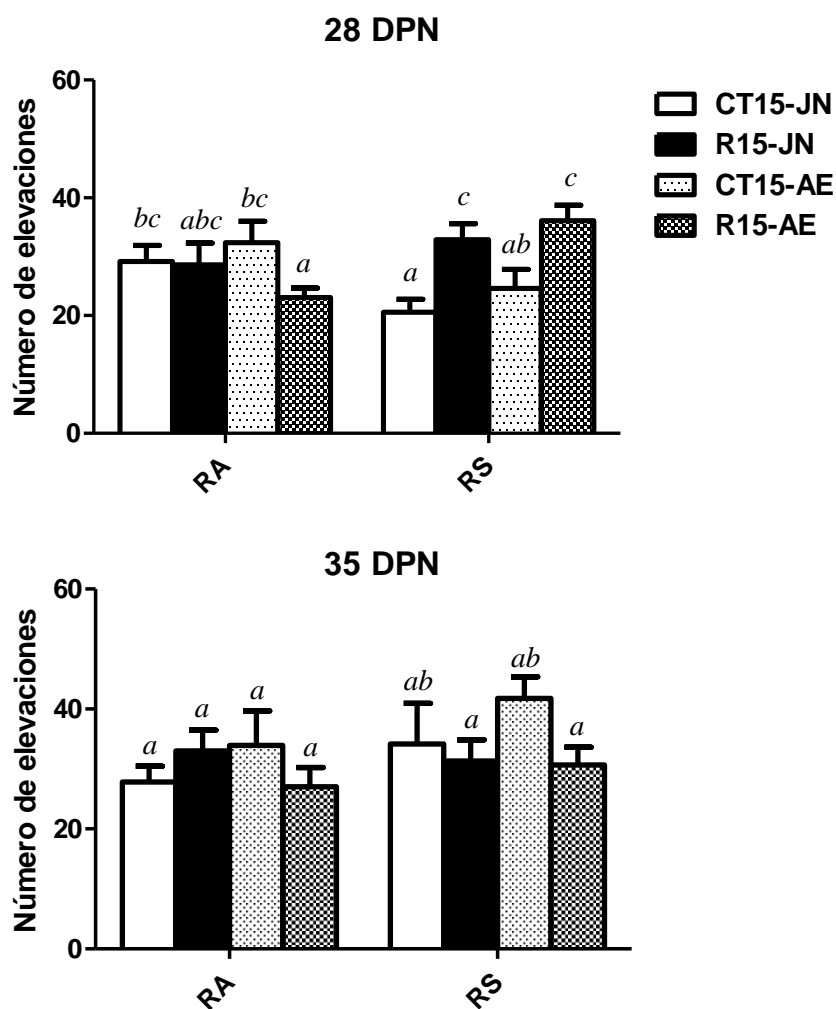
**Figura 13c.** Número de elevaciones (climbing y rearing) en la tarea de CA. Gráfico superior: animales evaluados a los 28 DPN; Gráfico inferior: animales evaluados a los 35 DPN. CT7-JN: Control a los 7 DPN, jaula normal; R7-JN: Ruido a los 7 DPN, jaula normal; CT7-AE: Control a los 7 DPN, ambiente enriquecido; R7-AE: Ruido a los 7 DPN, ambiente enriquecido; RA: Ruido agudo; RS: Ruido sub-crónico. Letras distintas (a,b,c,d) simbolizan diferencias significativas con  $p < 0.05$ . Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM del número de elevaciones (climbing y rearing) en la tarea de CA.

Por otro lado, se observó un efecto significativo en el número de elevaciones en animales expuestos a los 15 DPN y evaluados a los 28 DPN (Figura 13d, ANOVA de tres vías,  $F_{7,77} = 2,69$ ,  $p < 0,05$ ). Dado que la interacción entre exposición y esquema fue significativa ( $F_{1,77} = 12,65$ ,  $p < 0,01$ ), se realizó un



análisis de efecto simple (RA: ANOVA de dos vías,  $F_{3,38} = 1,29$ , NS. RS: ANOVA de dos vías,  $F_{3,37} = 6,35$ ,  $p < 0,01$ . Entre factor: exposición (control o ruido),  $F_{1,37} = 17,29$ ,  $p < 0,01$ . Dentro del factor: esquema (RA o RS),  $F_{1,37} = 1,74$ , NS). Los resultados muestran una disminución significativa cuando los animales expuestos a RA se alojaron en AE y un aumento significativo en los animales expuestos a RS, tanto después del alojamiento en JN como en AE (comparaciones post hoc: RA: control vs ruido: JN, NS; AE,  $p < 0,05$ ; RS: control vs ruido (JN y AE),  $p < 0,05$ ).

Cuando estos animales fueron evaluados a los 35 DPN, no se observaron diferencias significativas entre los animales expuestos al ruido y el grupo control correspondiente en los diferentes esquemas de exposición, ni en condiciones de alojamiento en JN ni en AE (figura 13d, ANOVA de tres vías,  $F_{3,38} = 1,40$ , NS).



**Figura 13d.** Número de elevaciones (climbing y rearing) en la tarea de CA. Gráfico superior: animales evaluados a los 28 DPN; Gráfico inferior: animales evaluados a los 35 DPN. CT15-JN: Control a los 15 DPN, jaula normal; R15-JN: Ruido a los 15 DPN, jaula normal; CT15-AE: Control a los 15 DPN, ambiente enriquecido; R15-AE: Ruido a los 15 DPN, ambiente enriquecido; RA: Ruido agudo; RS: Ruido sub-crónico. Letras distintas (a,b,c) simbolizan diferencias significativas con  $p < 0.05$ . Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM del número de elevaciones (Climbing y rearing) en la tarea de CA.

### 5.2.3. Laberinto en Cruz Elevado (LCE)

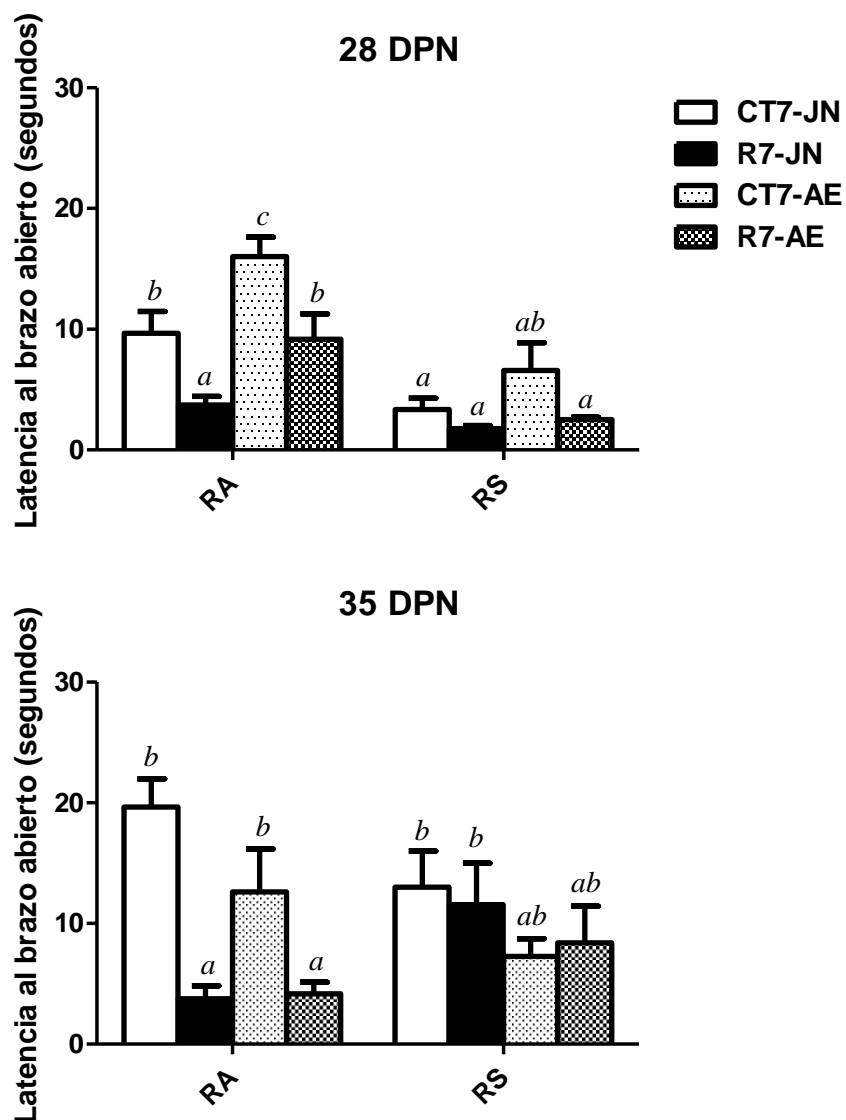
Los parámetros medidos en los brazos abiertos del LCE, como la latencia para ingresar y el número de entradas a los mismos, se pueden asociar con las conductas relacionadas a la ansiedad. A su vez, el comportamiento de “head dipping” (HD: definido como cada vez que el animal se detuvo a mover la cabeza por fuera del brazo en donde tenía el resto del cuerpo y las cuatro patas) y de “stretched attend posture” (SAP: definido como cada vez que la rata balanceó su cuerpo hacia adelante y luego se retrajo a la posición original sin avanzar) se pueden asociar con la evaluación de riesgos.

#### a) Latencia para ingresar a los brazos abiertos

La figura 14a muestra un efecto principal significativo sobre la latencia para entrar en los BA del LCE (ANOVA de tres vías,  $F_{7,52} = 10,69$ ,  $p < 0.01$ ; entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,52} = 23,35$ ,  $p < 0,01$ ; alojamiento (JN o AE),  $F_{1,52} = 15,60$ ,  $p < 0,01$ ; dentro de los factores: esquema de exposición (RA o RS),  $F_{1,52} = 30,63$ ,  $p < 0,01$ ), observándose una disminución significativa en animales expuestos a los 7 DPN de acuerdo a RA, tanto en condiciones de alojamiento en JN como en AE, sin cambios significativos cuando se expusieron de acuerdo al esquema RS (comparaciones post hoc: control vs ruido, JN: RA,  $p < 0,05$ ; RS, NS. AE: RA,  $p < 0,05$ ; RS, NS).

Asimismo, se observó un efecto principal significativo en la latencia al BA en los animales expuestos a los 7 DPN de acuerdo al esquema RA, para ambas condiciones de alojamiento, en animales evaluados a 35 DPN (Figura 14a, ANOVA de tres vías,  $F_{7,43} = 3,90$ ,  $p < 0.01$ ; entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,43} = 14,44$ ,  $p < 0,01$ ; alojamiento (JN o AE),  $F_{1,43} = 1,41$ , NS; dentro de los factores: esquema de exposición (RA o RS),  $F_{1,43} = 0,04$ , NS). Dado que la

interacción entre exposición y esquema fue significativa ( $F_{1,43}= 10,29$ ,  $p< 0,01$ ), se realizó un análisis de efecto simple (RA: ANOVA de dos vías,  $F_{3,25}= 8,33$ ,  $p< 0,01$ . Entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,25}= 24,38$ ,  $p< 0,01$ . Dentro del factor alojamiento (JN o AE),  $F_{1,25}= 0,09$ , NS. RS:  $F_{3,17}= 0,50$ , NS). Los datos muestran una disminución significativa en los animales expuestos al ruido de acuerdo al esquema RA, sin producirse cambios en aquellos expuestos a RS (comparaciones post hoc: control vs ruido: RA: JN y AE,  $p< 0,05$ ; RS: JN y AE, NS).

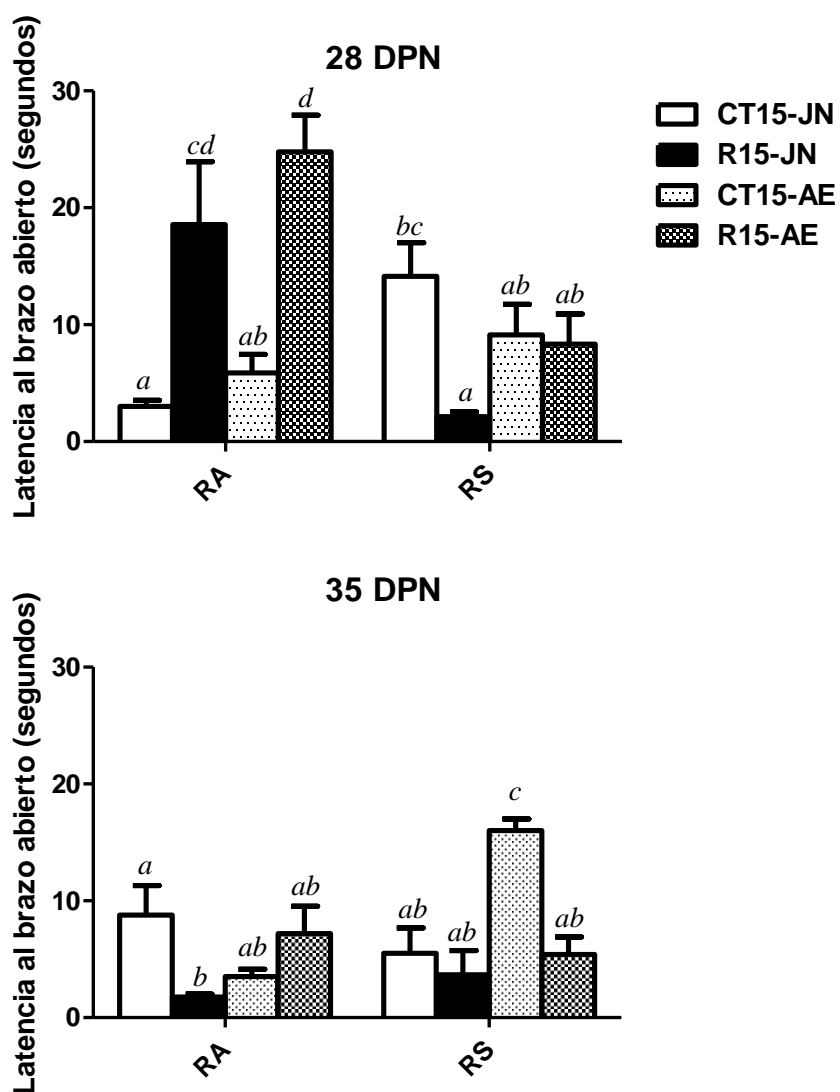


**Figura 14a.** Latencia al brazo abierto (segundos) en la tarea de LCE. Gráfico superior: animales evaluados a los 28 DPN; Gráfico inferior: animales evaluados a los 35 DPN. CT7-JN: Control a los 7 DPN, jaula normal; R7-JN: Ruido a los 7 DPN, jaula normal; CT7-AE: Control a los 7 DPN, ambiente enriquecido; R7-AE: Ruido a los 7 DPN, ambiente enriquecido; RA: Ruido agudo; RS: Ruido sub-crónico. Letras distintas (a,b,c) simbolizan diferencias significativas con  $p < 0.05$ . Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM de la latencia al brazo abierto (segundos) en la tarea de LCE.

Cuando los animales fueron expuestos a los 15 DPN de acuerdo al esquema RA, se observó un efecto principal significativo (Figura 14b, ANOVA de tres vías,  $F_{7,55} = 5,85$ ,  $p < 0,01$ ; entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,55} = 5,59$ ,  $p < 0,01$ ; alojamiento (JN o AE),  $F_{1,55} = 0,45$ , NS; dentro del factor: esquema (RA o RS),  $F_{1,55} = 3,25$ , NS). Dado que se observó una interacción significativa entre la exposición y el esquema ( $F_{1,55} = 28,12$ ,  $p < 0,01$ ), se realizó un análisis de efecto simple. Se encontró un aumento significativo en la latencia al brazo abierto en animales expuestos a los 15 DPN de acuerdo al esquema RA, alojados en JN y AE (ANOVA de dos vías,  $F_{3,28} = 7,07$ ,  $p < 0,01$ ; entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,28} = 19,61$ ,  $p < 0,01$ ; dentro del factor: alojamiento (JN o AE),  $F_{1,28} = 1,40$ , NS. Comparaciones post hoc: control vs ruido: JN y AE,  $p < 0,05$ ). Por otro lado, dado que se observó un efecto principal significativo después de la exposición a RS (ANOVA de dos vías,  $F_{3,26} = 4,67$ ,  $p < 0,01$ ; entre factor: exposición (control o ruido),  $F_{1,26} = 8,18$ ,  $p < 0,01$ ; dentro del factor: alojamiento (JN o AE),  $F_{1,26} = 0,03$ , NS) y se observó una interacción significativa entre la exposición y el alojamiento ( $F_{1,26} = 5,79$ ,  $p < 0,05$ ), se realizó un análisis de efecto simple, que mostró una disminución de la latencia en los animales expuestos al ruido alojados en JN cuando se comparó con sus respectivos controles ( $p < 0,05$ ).

Cuando los animales fueron expuestos a los 15 DPN y evaluados en el DPN 35, se encontró un efecto principal significativo (Figura 14b, ANOVA de tres vías,  $F_{7,39} = 2,84$ ,  $p < 0.05$  entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,39} = 4,97$ ,  $p < 0,05$ ; alojamiento (JN o AE),  $F_{1,39} = 1,99$ , NS; dentro del factor: esquema (RA o RS),  $F_{1,39} = 0,52$ , NS). Dado que se observó una interacción significativa entre la exposición, el alojamiento y el esquema ( $F_{1,39} = 8,51$ ,  $p < 0,01$ ), se realizó un análisis de efecto simple. Se encontró una disminución significativa de la latencia al BA en los animales expuestos de acuerdo al esquema RA y alojados en JN

(ANOVA de dos vías,  $F_{3,21} = 4,45$ ,  $p < 0,05$ ; entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,21} = 0,94$ , NS. Dentro del factor: alojamiento (JN o AE),  $F_{1,21} = 0,04$ , NS). Además, se observó una disminución de la latencia al BA en las ratas expuestas de acuerdo al esquema RS y alojados en AE (ANOVA de dos vías,  $F_{3,17} = 6,46$ ,  $p < 0,01$ ; entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,17} = 7,75$ ,  $p < 0,05$ . Dentro del factor: alojamiento (JN o AE),  $F_{1,17} = 6,85$ ,  $p < 0,05$ . Comparaciones post hoc: control vs ruido: RA: JN,  $p < 0,05$ ; AE, NS; RS: JN, NS; AE,  $p < 0,05$ ).



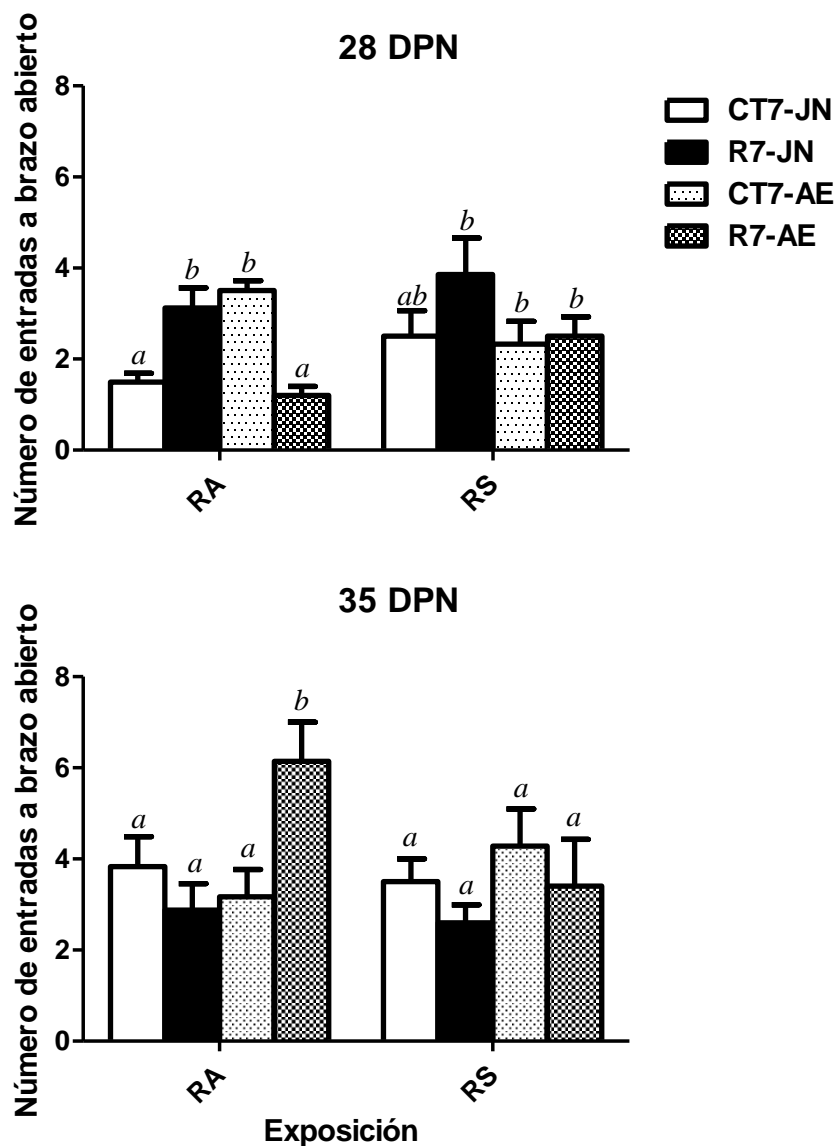
**Figura 14b.** Latencia al brazo abierto (segundos) en la tarea de LCE. Gráfico superior: animales evaluados a los 28 DPN; Gráfico inferior: animales evaluados a los 35 DPN. CT15-JN: Control a los 15 DPN, jaula normal; R15-JN: Ruido a los 15 DPN, jaula normal; CT15-AE: Control a los 15 DPN, ambiente enriquecido; R15-AE: Ruido a los 15 DPN, ambiente enriquecido; RA: Ruido agudo; RS: Ruido sub-crónico. Letras distintas (a,b,c,d) simbolizan diferencias significativas con  $p < 0.05$ . Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM de la latencia al brazo abierto (segundos) en la tarea de LCE.

#### b) Número de entradas a los brazos abiertos

La Figura 14c muestra un efecto principal significativo sobre el número de entradas a los brazos abiertos del LCE en animales expuestos a los 7 DPN y evaluados a los 28 DPN (ANOVA de tres vías,  $F_{7,55} = 4,19$ ,  $p < 0.01$ ; entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,55} = 0,88$ , NS; alojamiento (JN o AE),  $F_{1,55} = 0,10$ , NS; dentro del factor: esquema (RA o RS),  $F_{1,55} = 0,75$ , NS). Dado que algunas interacciones fueron significativas (entre exposición y alojamiento:  $F_{1,55} = 18,31$ ,  $p < 0,01$ ; entre exposición, alojamiento y esquema:  $F_{1,55} = 4,47$ ,  $p < 0,05$ ), se realizó un análisis de efecto simple (JN: ANOVA de dos vías,  $F_{3,28} = 3,82$ ,  $p < 0,05$ . Entre factor: exposición (control o ruido),  $F_{1,28} = 8,70$ ,  $p < 0,01$ ; Dentro del factor: esquema (RA o RS),  $F_{1,28} = 0,07$ , NS. AE: ANOVA de dos vías,  $F_{3,26} = 8,61$ ,  $p < 0,01$ . Entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,26} = 12,29$ ,  $p < 0,01$ . Dentro del factor: esquema (RA o RS),  $F_{1,26} = 0,29$ , NS). Los datos muestran un aumento en el número de entradas por parte de los animales alojados en JN y una disminución cuando se alojaron en AE, luego de la exposición a RA (comparaciones post hoc: control vs ruido: JN,  $p < 0,05$ ; AE,  $p < 0,01$ ), sin observarse cambios en las ratas expuestas durante cinco días (RS). Dado que dentro de AE la interacción entre exposición y esquema fue significativa ( $F_{1,26} = 13,27$ ,  $p < 0,01$ ), se realizó un análisis de efecto simple. Los datos muestran un aumento significativo en los animales expuestos a 7 DPN de acuerdo al esquema RA y evaluados a los 28 DPN ( $p < 0,05$ ), sin observarse cambios en las ratas expuestas a RS.

Por otra parte, al evaluar a este grupo de ratas a los 35 DPN, se observó un efecto principal significativo (Figura 14c, ANOVA de tres vías,  $F_{7,47} = 2,57$ ,  $p < 0.05$ ; entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,47} = 0,04$ , NS; alojamiento (JN o AE),  $F_{1,47} = 5,37$ ,  $p < 0.05$ ; dentro del factor: esquema (RA o RS),  $F_{1,47} = 1,21$ , NS). Dado que se produjo una interacción significativa entre exposición y alojamiento ( $F_{1,47} =$

4,09,  $p < 0,05$ ), se realizó un análisis de efecto simple (RA: ANOVA de dos vías,  $F_{3,26} = 4,87$ ,  $p < 0,01$ ; entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,26} = 1,69$ , NS. Dentro del factor: alojamiento (JN o AE),  $F_{1,26} = 4,84$ ,  $p < 0,05$ ). RS:  $F_{3,20} = 0,87$ , NS). Los resultados mostraron un aumento en el número de entradas al BA solo para los animales expuestos a RA alojados en AE, sin encontrarse diferencias en las ratas alojadas en JN, ni en los animales expuestos a RS (comparaciones post hoc: control vs ruido: RA: JN, NS; AE,  $p < 0,05$ ; RS: JN y AE, NS).

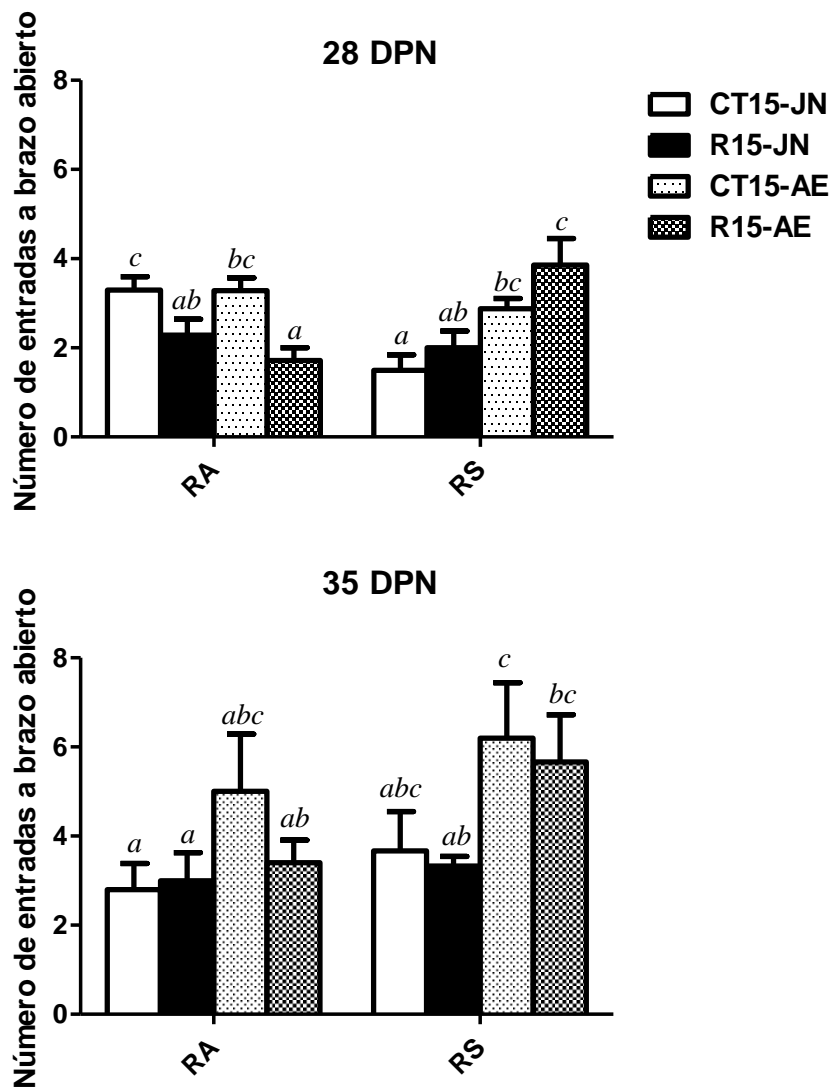


**Figura 14c.** Número de entradas al brazo abierto en la tarea de LCE. Gráfico superior: animales evaluados a los 28 DPN; Gráfico inferior: animales evaluados a los 35 DPN. CT7-JN: Control a los 7 DPN, jaula normal; R7-JN: Ruido a los 7 DPN, jaula normal; CT7-AE: Control a los 7 DPN, ambiente enriquecido; R7-AE: Ruido a los 7 DPN, ambiente enriquecido; RA: Ruido agudo; RS: Ruido sub-crónico. Letras distintas (a,b) simbolizan diferencias significativas con  $p < 0.05$ . Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM del número de entradas al brazo abierto en la tarea de LCE.

La Figura 14d muestra un efecto principal significativo sobre el número de entradas a los brazos abiertos del LCE en animales expuestos a los 15 DPN (ANOVA de tres vías,  $F_{7,60} = 4,77$ ,  $p < 0.01$ ). Dado que algunas interacciones resultaron significativas (entre la exposición y el esquema:  $F_{1,60} = 12,19$ ,  $p < 0,01$ ; entre exposición, esquema y alojamiento:  $F_{1,60} = 15,21$ ,  $p < 0,01$ ), se realizó un análisis de efecto simple (JN: ANOVA de dos vías,  $F_{3,30} = 5,15$ ,  $p < 0,01$ . Entre factor: Exposición (control o ruido),  $F_{1,30} = 2,02$ , NS. Dentro del factor: esquema (RA o RS),  $F_{1,30} = 8,81$ ,  $p < 0,01$ . AE: ANOVA de dos vías,  $F_{3,29} = 4,85$ ,  $p < 0,01$ . Entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,29} = 0,15$ , NS. Dentro del factor: esquema (RA o RS),  $F_{1,29} = 5,83$ ,  $p < 0,05$ ). Dado que se encontró una interacción significativa entre la exposición y el esquema en animales expuestos a RA, tanto para los animales de JN como de AE (JN:  $F_{1,30} = 4,63$ ,  $p < 0,05$ ; AE:  $F_{1,29} = 8,56$ ,  $p < 0,01$ ), se realizó un análisis de efecto simple en ambos casos. Los datos mostraron una disminución significativa en el número de entradas al BA en los animales expuestos a los 15 DPN de acuerdo al esquema RA, tanto en condiciones JN como EE, sin encontrarse cambios en animales expuestos de acuerdo a RS (comparaciones post hoc: control vs ruido: JN: RA,  $p < 0,05$ ; RS, NS. AE: RA,  $p < 0,05$ ; RS, NS).

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre los animales expuestos al ruido y el grupo control correspondiente, para los diferentes esquemas de exposición, tanto en condiciones de JN como de AE, cuando se evaluaron a los 35 DPN (figura 14d, ANOVA de tres vías,  $F_{7,40} = 2,10$ , NS).





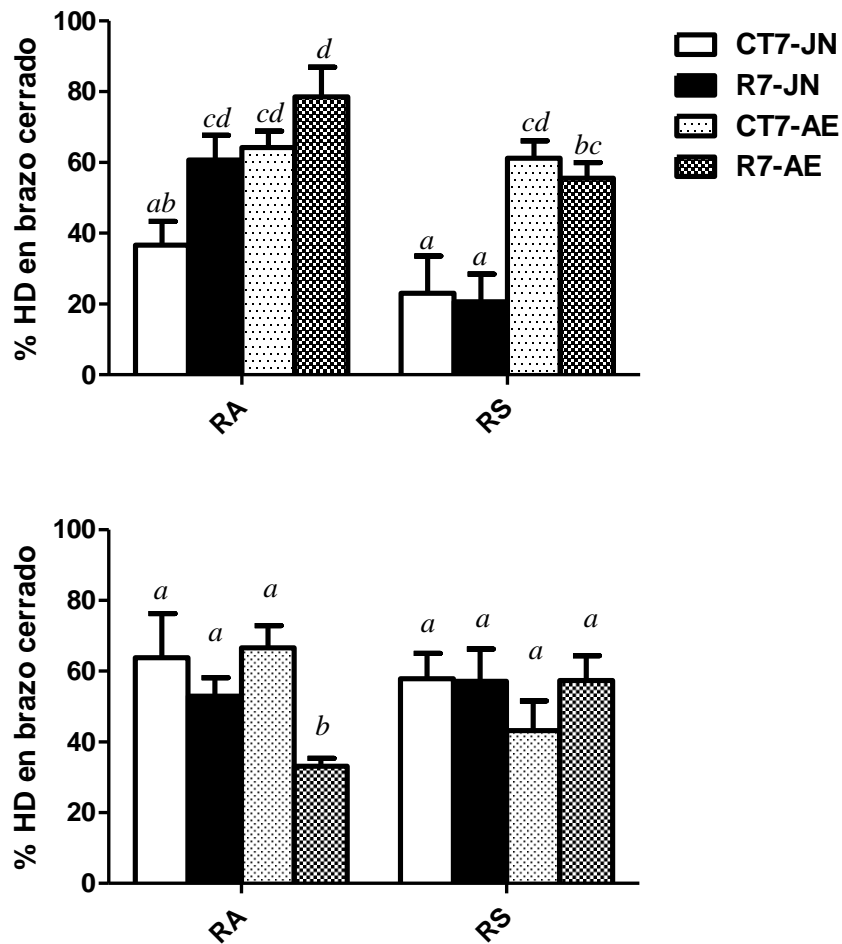
**Figura 14d.** Número de entradas al brazo abierto en la tarea de LCE. Gráfico superior: animales evaluados a los 28 DPN; Gráfico inferior: animales evaluados a los 35 DPN. CT15-JN: Control a los 15 DPN, jaula normal; R15-JN: Ruido a los 15 DPN, jaula normal; CT15-AE: Control a los 15 DPN, ambiente enriquecido; R15-AE: Ruido a los 15 DPN, ambiente enriquecido; RA: Ruido agudo; RS: Ruido sub-crónico. Letras distintas (a,b,c) simbolizan diferencias significativas con  $p < 0.05$ . Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM del número de entradas al brazo abierto en la tarea de LCE.

c) % de Head Dipping (HD).

Cuando se analizó el % de HD, se observó un efecto principal significativo en animales de 7 DPN evaluados a los 28 DPN (Figura 14e; ANOVA de tres vías,  $F_{7,56} = 8,38$ ,  $p < 0,01$ . Entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,56} = 1,45$ , NS; alojamiento (JN o AE),  $F_{1,56} = 36,86$ ,  $p < 0,01$ . Dentro de los factores: esquema de

exposición (RA o RS),  $F_{1,56} = 13$   $p < 0,01$ ). Dado que la interacción entre exposición y esquema fue significativa ( $F_{1,56} = 5,29$ ,  $p < 0,05$ ), se realizó un análisis de efecto simple (RA: ANOVA de dos vías,  $F_{3,29} = 6,62$ ,  $p < 0,01$ . Entre factor: exposición (control o ruido),  $F_{1,29} = 6,13$ ,  $p < 0,05$ . Dentro del factor: alojamiento (JN o AE),  $F_{1,29} = 13,17$ ,  $p < 0,01$ . RS: ANOVA de dos vías,  $F_{3,26} = 7,26$ ,  $p < 0,01$ . Entre factor: exposición (control o ruido),  $F_{1,26} = 0,12$ , NS. Dentro del factor: alojamiento (JN o AE),  $F_{1,26} = 21,62$ ,  $p < 0,01$ ). Los datos muestran un aumento significativo en el % de HD entre animales expuestos a los 7 DPN de acuerdo al esquema RA y alojados en JN cuando se compararon con sus controles, sin producirse cambios en los animales alojados en AE. No se observaron cambios en los animales expuestos a RS en comparación con el grupo control correspondiente (comparaciones post hoc, control vs ruido, RA: JN,  $p < 0,05$ ; AE, NS. RS: JN y AE, NS).

En animales evaluados a los 35 días de edad, no se encontró un efecto principal significativo en el % de HD en ratas expuestas a los 7 DPN (Figura 14e, ANOVA de tres vías,  $F_{7,40} = 1,75$ , NS). Dado que se encontró una interacción significativa entre exposición y esquema ( $F_{1,40} = 5,17$ ,  $p < 0,05$ ), se realizó un análisis de efecto simple (RA: ANOVA de dos vías,  $F_{3,21} = 3,74$ ,  $p < 0,05$ . Entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,21} = 7,67$ ,  $p < 0,05$ . Dentro del factor alojamiento (JN o AE),  $F_{1,21} = 1,41$ , NS; RS:  $F_{3,18} = 0,56$ , NS). Los resultados mostraron una disminución significativa en el % HD en animales expuestos a los 7 DPN de acuerdo al esquema RA y alojados en AE, sin observarse cambios en el resto de los grupos (comparaciones post hoc: control vs ruido: RA: JN, NS; AE,  $p < 0,05$ ; RS: JN y AE, NS).

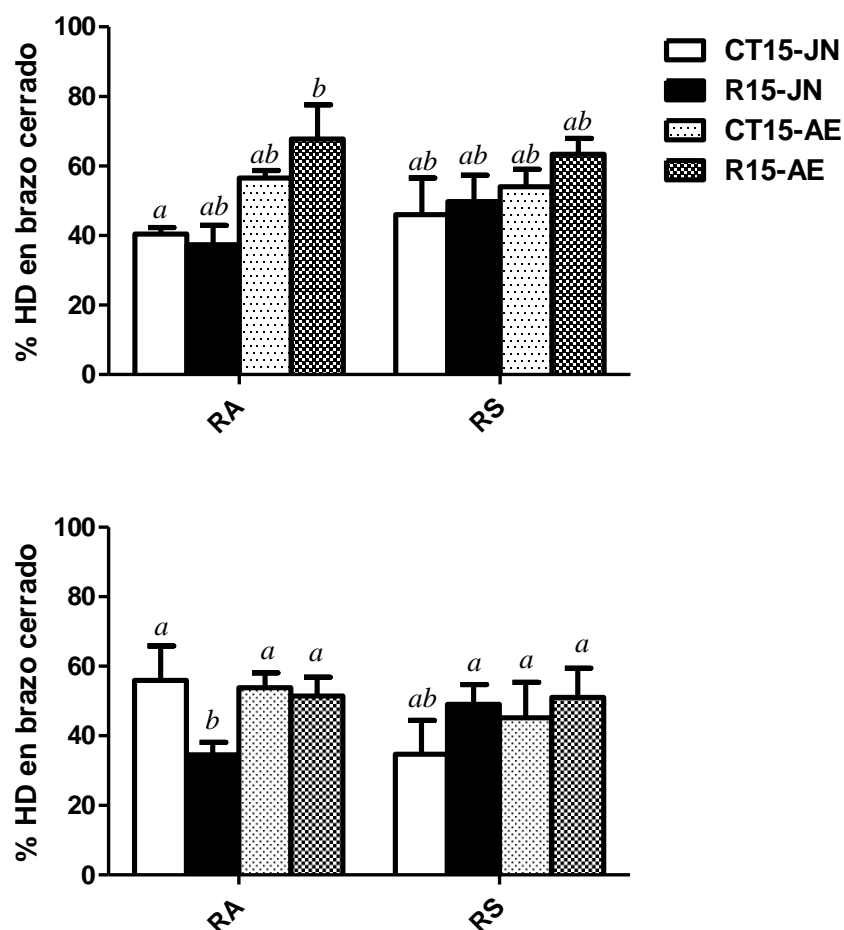


**Figura 14e.** % de HD en brazo cerrado en la tarea de LCE. Gráfico superior: animales evaluados a los 28 DPN; Gráfico inferior: animales evaluados a los 35 DPN. CT7-JN: Control a los 7 DPN, jaula normal; R7-JN: Ruido a los 7 DPN, jaula normal; CT7-AE: Control a los 7 DPN, ambiente enriquecido; R7-AE: Ruido a los 7 DPN, ambiente enriquecido; RA: Ruido agudo; RS: Ruido sub-crónico. Letras distintas (a,b,c,d) simbolizan diferencias significativas con  $p < 0.05$ . Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM del % de HD en brazo cerrado en la tarea de LCE.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre los animales expuestos al ruido y el grupo control correspondiente a los 15 DPN cuando se evaluaron a los 28 DPN, tanto en condiciones de alojamiento en JN como en AE (figura 14f, ANOVA de tres vías,  $F_{7,63} = 1,08$ , NS).

En cambio, cuando se evaluaron las ratas a los 35 DPN, no se observó un efecto principal significativo (Figura 14f, ANOVA de tres vías,  $F_{7,32} = 1,62$ , NS). Sin embargo, se observó una disminución significativa en el % de HD en los animales expuestos a RA alojados en JN, sin encontrarse diferencias significativas entre

animales expuestos y controles alojados en AE, ni en los animales expuestos a RS. Dado que se encontró una interacción significativa entre exposición y esquema ( $F_{7,32} = 5,31$ ,  $p < 0,05$ ) se realizó un análisis de efecto simple (RA: ANOVA de dos vías,  $F_{3,17} = 2,37$ , NS. Entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,17} = 3,21$ , NS. Dentro del factor alojamiento (JN o AE),  $F_{1,17} = 1,46$ , NS; RS,  $F_{3,12} = 0,82$ , NS), mostrando una disminución significativa en este parámetro solo en los animales expuestos a RA y alojados en JN (comparaciones post hoc: control vs ruido: RA: JN,  $p < 0,05$ ; AE, NS; RS: JN y AE, NS).



**Figura 14f.** % de HD en brazo cerrado en la tarea de LCE. Gráfico superior: animales evaluados a los 28 DPN; Gráfico inferior: animales evaluados a los 35 DPN. CT15-JN: Control a los 15 DPN, jaula normal; R15-JN: Ruido a los 15 DPN, jaula normal; CT15-AE: Control a los 15 DPN, ambiente enriquecido; R15-AE: Ruido a los 15 DPN, ambiente enriquecido; RA: Ruido agudo; RS: Ruido sub-crónico. Letras distintas (a,b) simbolizan diferencias significativas con  $p < 0.05$ . Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM del % de HD en brazo cerrado en la tarea de LCE.

d) % de Stretched Attend Postures (SAP).

Finalmente, no se observaron diferencias significativas entre los animales expuestos al ruido y el grupo control correspondiente en animales de 7 DPN expuestos de acuerdo al esquema RA, tanto en condiciones de alojamiento en JN como en AE, evaluados tanto a los 28 DPN (ANOVA de tres vías,  $F_{7,59}= 1,65$ , NS), como a los 35 DPN (ANOVA de tres vías,  $F_{7,44}= 1,12$ , NS). Tampoco se observaron diferencias entre los animales expuestos a los 15 DPN de acuerdo al esquema RA cuando se los comparó con sus controles, alojados en JN o en AE ni en aquellos evaluados a los 28 DPN (ANOVA de tres vías,  $F_{7,56}= 1,64$ , NS), ni a los 35 DPN (ANOVA de tres vías,  $F_{7,37}= 0,97$ , NS, datos no mostrados).

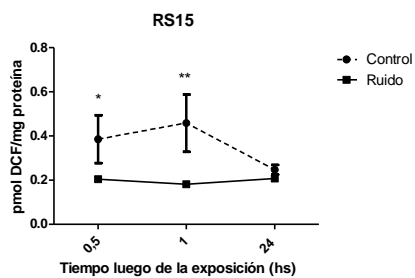
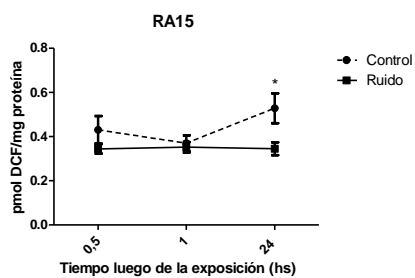
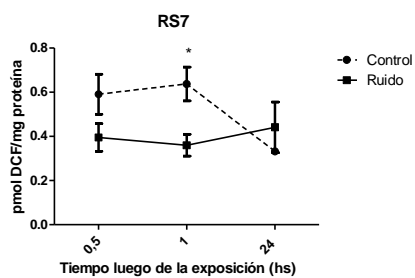
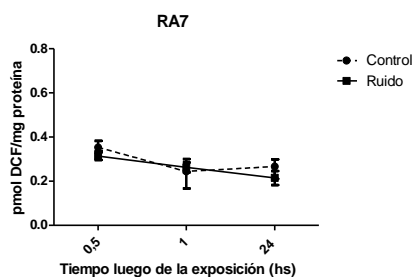
### **5.3. Determinación de ROS y Catalasa**

La figura 15a (gráficos de la izquierda) muestra el curso temporal temprano de los niveles de ROS en el HC. No se encontró un efecto principal significativo entre los animales expuestos a los 7 DPN y sus respectivos controles, tanto luego del esquema RA (ANOVA de dos vías,  $F_{2,21}= 1,83$ , NS) como del RS (ANOVA de dos vías,  $F_{2,24}= 3,48$ , NS). Sin embargo, 1 h después de la exposición se observó una disminución significativa en los niveles de ROS en el HC de ratas de 7 DPN expuesta de acuerdo al esquema RS ( $p < 0,05$ ) que se restableció luego de 24 hs. En cambio, se observó un efecto significativo principal entre los animales expuestos a los 15 DPN y sus respectivos controles, tanto luego del esquema RA (ANOVA de dos vías,  $F_{2,20}= 5,23$ ,  $p < 0,05$ ) como del RS (ANOVA de dos vías,  $F_{2,20}= 9,96$ ,  $p < 0,05$ ), encontrándose una disminución significativa en ratas de 15 DPN expuestas de acuerdo al esquema RA a las 24 hs ( $p < 0,05$ ) y de ratas expuestas de acuerdo al esquema RS, tanto a la hora ( $p < 0,01$ ) como a las 24 horas ( $p < 0,05$ ) luego de la exposición.

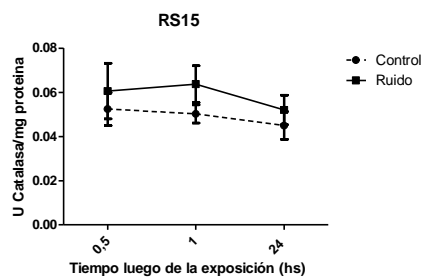
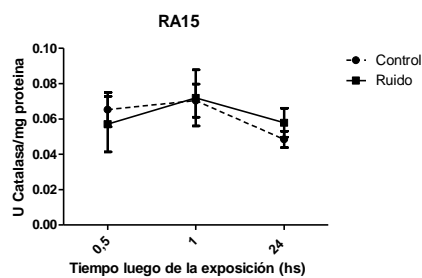
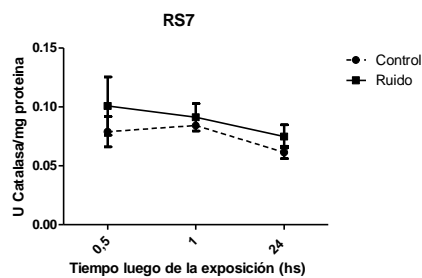
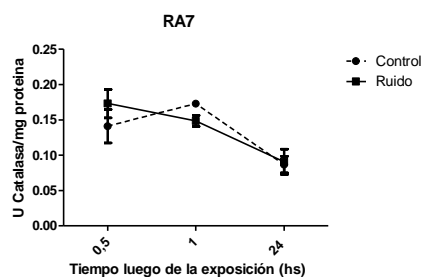
Paralelamente se analizó la actividad de CAT a tiempos cortos post-exposición, luego de los diferentes esquemas de exposición. No se encontraron diferencias significativas entre los animales expuestos y sus controles en ninguno de los grupos (Figura 15a, gráficos de la derecha: ratas de 7 DPN expuestas de

acuerdo al esquema RA,  $F_{2,14}= 0,07$ , NS) y RS ( $F_{2,14}= 1,86$ , NS); ratas de 15 DPN expuestas de acuerdo al esquema RA ( $F_{2,14}= 0,01$ , NS) y RS ( $F_{2,14}= 2,12$ , NS).

## ROS



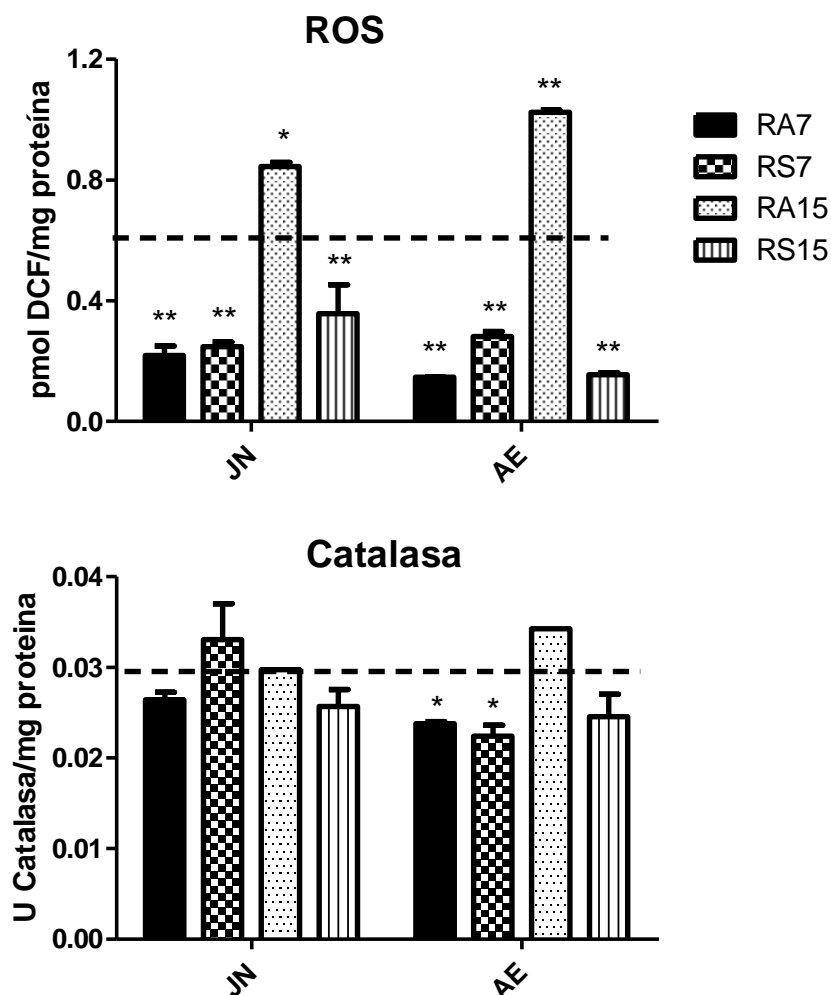
## Catalasa



**Figura 15a.** Niveles de ROS y Unidades de CAT en HC, expresados por mg de proteína. Gráficos de la izquierda: ROS; Gráficos de la derecha: CAT. RA7: Animales expuestos en el DPN 7 y sus controles; RS7: Animales expuestos entre los DPN 7 y 11, y sus controles; RA15: Animales expuestos en el DPN 15 y sus controles; RS15: Animales expuestos entre los DPN 15 y 19, y sus controles. \*, \*\*,  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  cuando se compara con animales control. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM de los niveles de ROS o CAT en HC, expresados por mg de proteína.

Cuando se compararon los niveles de ROS en el HC de los animales expuestos y sus respectivos controles a largo plazo (Figura 15b), se observó una disminución significativa en los animales expuestos a los 7 DPN, tanto en aquellos expuestos de acuerdo a RA como RS como en los animales expuestos a los 15 DPN de acuerdo al esquema RS, alojados tanto en JN como en AE ( $p < 0,01$ ). Por el contrario, se observó un aumento significativo en los HC de ratas expuestas a los 15 DPN de acuerdo al esquema RA, cuando se compararon con los animales controles, tanto los alojados en condiciones de JN ( $p < 0,05$ ) como de AE ( $p < 0,01$ ).

Por otra parte, cuando se analizaron los niveles de CAT a largo plazo (Figura 15b), no se encontraron diferencias significativas entre los animales expuestos a las distintas edades y sus controles, alojados en JN. Al comparar las ratas alojadas en AE, se observó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en los animales expuestos a los 7 DPN (de acuerdo a ambos esquemas, RA y RS), sin encontrarse diferencias entre las ratas expuestas a los 15 DPN y sus controles.



**Figura 15b.** Niveles de ROS y Unidades de CAT en el HC, expresados por mg de proteína (DPN 28). Gráfico superior: ROS; Gráfico inferior: CAT. Línea punteada: Controles. RA7: Animales expuestos en el DPN 7; RS7: Animales expuestos entre los DPN 7 y 11; RA15: Animales expuestos en el DPN 15; RS15: Animales expuestos entre los DPN 15 y 19. JN: Jaula normal; AE: Ambiente enriquecido. \*, \*\*,  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  cuando se compara con animales control. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM de los niveles de ROS y CAT en el HC, expresados por mg de proteína.

## 5.4. Resultados de Western Blot

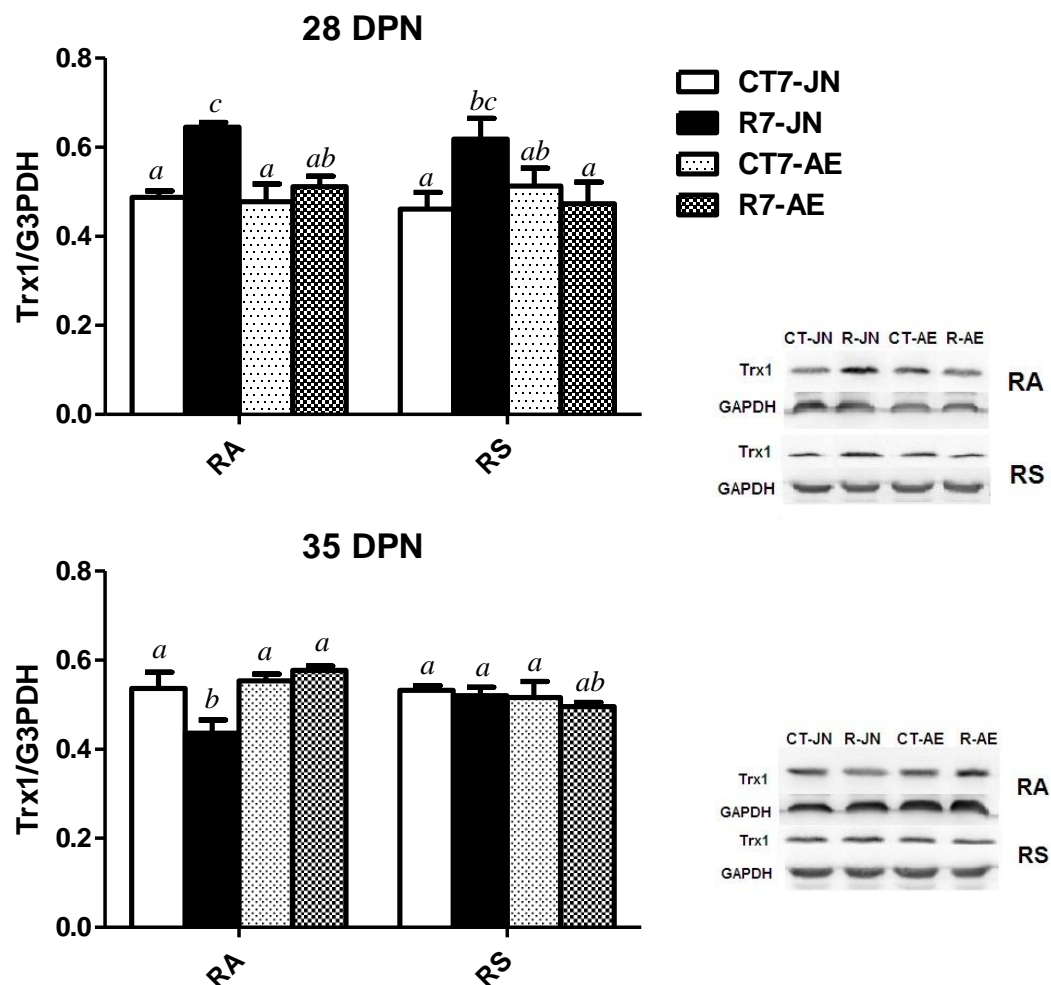
### 5.4.1. Niveles de Trx1 en el hipocampo

La Figura 16a muestra un efecto principal significativo cuando los animales fueron expuestos a los 7 DPN y evaluados a los 28 DPN (ANOVA de tres vías,  $F_{7,42} = 2,82$ ,  $p < 0,05$ . Entre los factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,42} = 6,08$ ,  $p <$



0,05; alojamiento (JN o AE),  $F_{1,42} = 4,17$ ,  $p < 0,05$ . Dentro de los factores: esquema (RA o RS),  $F_{1,42} = 0,5$ , NS). Dado que la interacción entre la exposición y el alojamiento fue significativa ( $F_{1,42} = 8,32$ ,  $p < 0,01$ ), se realizó un análisis de efectos simples (JN: ANOVA de dos vías,  $F_{3,20} = 5,47$ ,  $p < 0,01$ . Entre factor: exposición (control o ruido),  $F_{1,20} = 16,05$ ,  $p < 0,01$ . Dentro del factor: esquema (RA o RS),  $F_{1,20} = 0,49$ , NS. AE: ANOVA de dos vías,  $F_{3,21} = 0,27$ , NS). Los resultados mostraron un aumento en los niveles de Trx1 en el HC, tanto en los animales expuestos a RA como a RS, que se restauró a los niveles de los controles correspondientes cuando los animales fueron alojados en AE (comparaciones post hoc: JN: control vs ruido: RA y RS,  $p < 0,05$ . AE: RA y RS, NS).

Por otra parte, los animales expuestos a los 7 DPN y evaluados a los 35 DPN (2 semanas de alojamiento en JN o AE) mostraron también un efecto principal significativo (Figura 16a, ANOVA de tres vías,  $F_{7,30} = 3,14$ ,  $p < 0,05$ ; entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,30} = 2,95$ , NS; alojamiento (JN o AE),  $F_{1,30} = 3,82$ , NS; dentro del factor: esquema (RA o RS),  $F_{1,30} = 0,05$ , NS), mientras que los animales expuestos durante 5 días consecutivos no mostraron diferencias. Dado que se observó una interacción significativa entre los factores esquema y alojamiento (ANOVA de tres vías,  $F_{7,30} = 7,83$ ,  $p < 0,05$ ), se realizó un análisis de efecto simple (RA: ANOVA de dos vías,  $F_{3,16} = 6,12$ ,  $p < 0,01$ . Entre factor: exposición (control o ruido),  $F_{1,16} = 3,13$ , NS. Dentro del factor: alojamiento (JN o AE),  $F_{1,16} = 9,96$ ,  $p < 0,01$ . RS: ANOVA de dos vías,  $F_{3,13} = 0,33$ , NS). Los resultados mostraron que las ratas expuestas a RA y alojadas en JN presentaban una disminución en los niveles de Trx1 en el HC en comparación con sus controles, mientras que no se registraron diferencias entre los animales alojados en AE (comparaciones post hoc: control vs ruido, RA: JN,  $p < 0,05$ ; AE, NS. RS: JN y AE, NS).

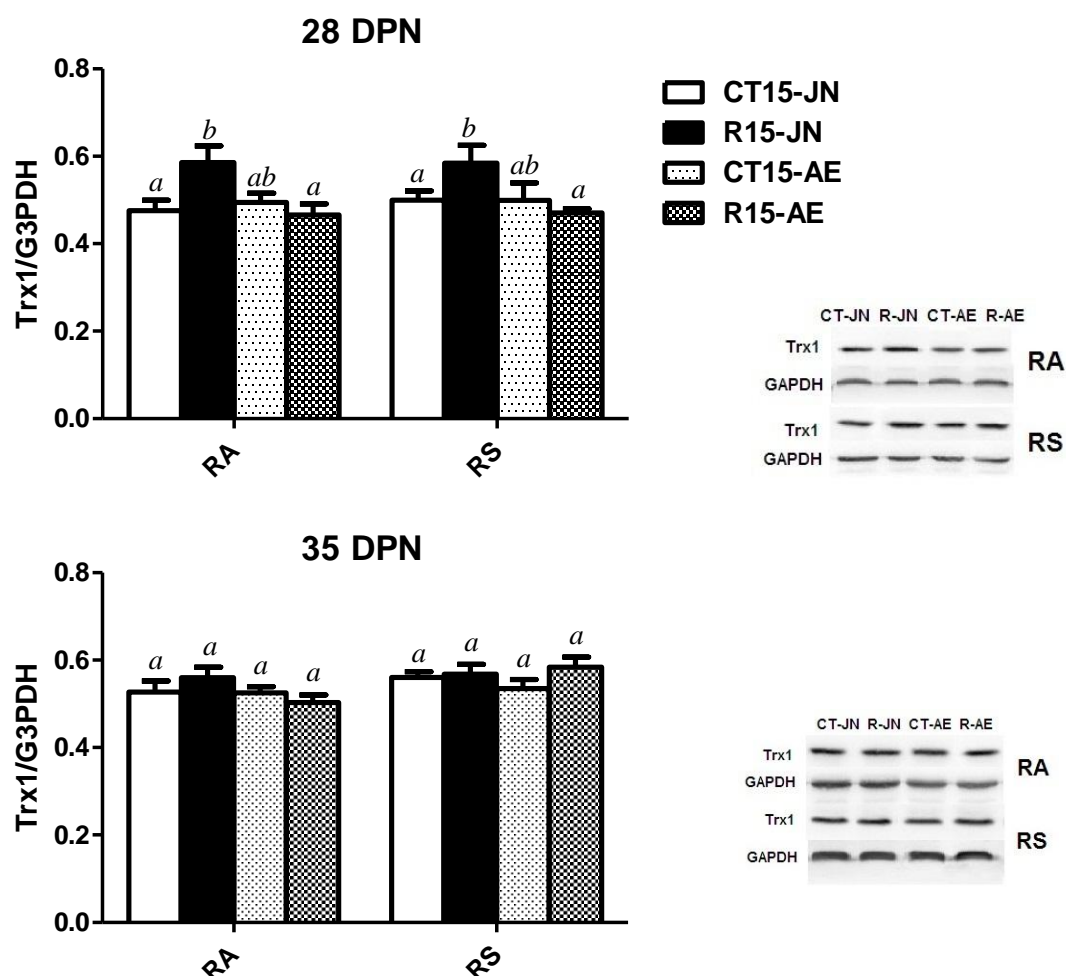


**Figura 16a.** Niveles de Trx1 en el HC. Gráfico superior: animales evaluados a los 28 DPN; Gráfico inferior: animales evaluados a los 35 DPN. CT7-JN: Control a los 7 DPN, jaula normal; R7-JN: Ruido a los 7 DPN, jaula normal; CT7-AE: Control a los 7 DPN, ambiente enriquecido; R7-AE: Ruido a los 7 DPN, ambiente enriquecido; RA: Ruido agudo; RS: Ruido sub-crónico. Letras distintas (a,b,c) simbolizan diferencias significativas con  $p < 0.05$ . Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM de los niveles de Trx1 en el HC.

De forma similar, los animales expuestos a los 15 días a RA y a RS mostraron un efecto significativo principal (Figura 16b, ANOVA de tres vías,  $F_{7,36} = 2,67$ ,  $p < 0,05$ . Entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,36} = 4,18$ ,  $p < 0,05$ ; alojamiento (JN o AE),  $F_{1,36} = 4,76$ ,  $p < 0,05$ . Dentro de los factores: esquema (RA o RS),  $F_{1,36} = 0,01$ , NS). Dado que la interacción entre la exposición y la alojamiento fue significativa ( $F_{1,36} = 9,72$ ,  $p < 0,01$ ), se realizó un análisis de efecto simple (JN: ANOVA de dos vías,  $F_{3,19} = 3,47$ ,  $p < 0,05$ . Entre factor: exposición (control o ruido),  $F_{1,19} = 10,41$ ,  $p < 0,01$ . Dentro del factor: esquema (RA o RS),  $F_{1,19} = 0,01$ , NS. AE:

ANOVA de dos vías,  $F_{3,16} = 0,40$ , NS). Los resultados mostraron un aumento cuando los animales expuestos de acuerdo a ambos esquemas se alojaron en JN, asemejándose a los valores de los controles correspondientes cuando se alojaron en AE (comparaciones post hoc: control vs ruido: JN: RA y RS,  $p < 0,05$ . AE: RA y RS, NS).

Cuando se analizaron los HC de ratas de 35 DPN, no se observaron diferencias significativas entre los animales expuestos al ruido y el grupo control correspondiente, en ninguno de los diferentes esquemas de exposición, tanto en condiciones de JN como de AE (figura 16b, ANOVA de tres vías,  $F_{7,31} = 0,89$ , NS).

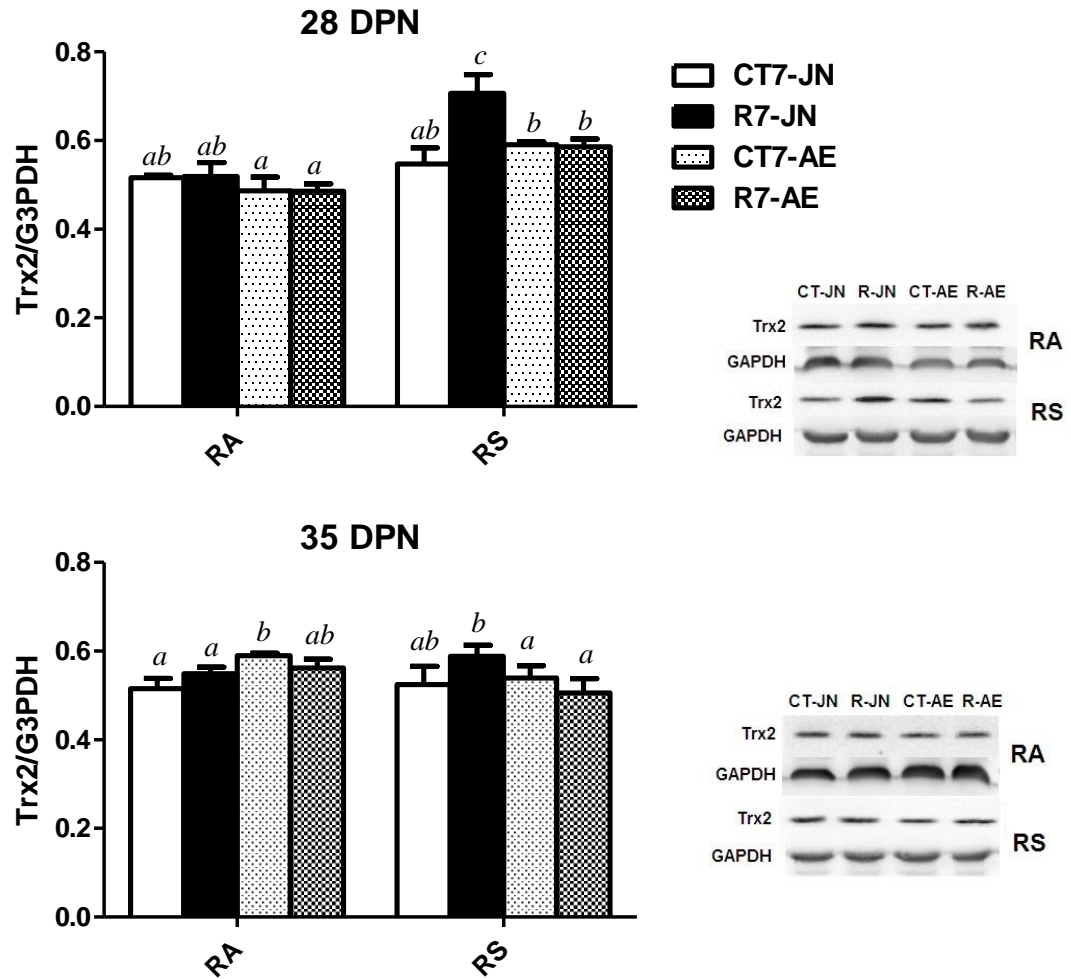


**Figura 16b.** Niveles de Trx1 en el HC. Gráfico superior: animales evaluados a los 28 DPN; Gráfico inferior: animales evaluados a los 35 DPN. CT15-JN: Control a los 15 DPN, jaula normal; R15-JN: Ruido a los 15 DPN, jaula normal; CT15-AE: Control a los 15 DPN, ambiente enriquecido; R15-AE: Ruido a los 15 DPN, ambiente enriquecido; RA: Ruido agudo; RS: Ruido sub-crónico. Letras distintas (a,b) simbolizan diferencias significativas con  $p < 0.05$ . Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM de los niveles de Trx1 en HC.

#### 5.4.2. Niveles de Trx2 en hipocampo.

La Figura 17a muestra un efecto principal sobre Trx2 en animales expuestos vida los 7 DPN y evaluados a los 28 DPN (ANOVA de tres vías,  $F_{7,36} = 6,05$ ,  $p < 0,01$ . Entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,36} = 3,17$ , NS; alojamiento (JN o AE),  $F_{1,36} = 1,80$ , NS. Dentro de los factores: esquema (RA o RS),  $F_{1,36} = 28,17$ ,  $p < 0,01$ ). Los resultados mostraron que se produjo un aumento significativo en los niveles de Trx2 en el HC de animales alojados en JN solo luego del esquema RS (comparaciones post hoc: control vs ruido: RA: JN y AE, NS; RS: JN,  $p < 0,05$ ; AE, NS).

Por otro lado, cuando se evaluaron los HC de las ratas de 35 DPN, no se observó un efecto principal significativo (Figura 17a, ANOVA de tres vías,  $F_{7,30} = 2,03$ , NS, comparaciones post hoc: control vs ruido: RA: JN y AE, NS; RS: JN y AE, NS).

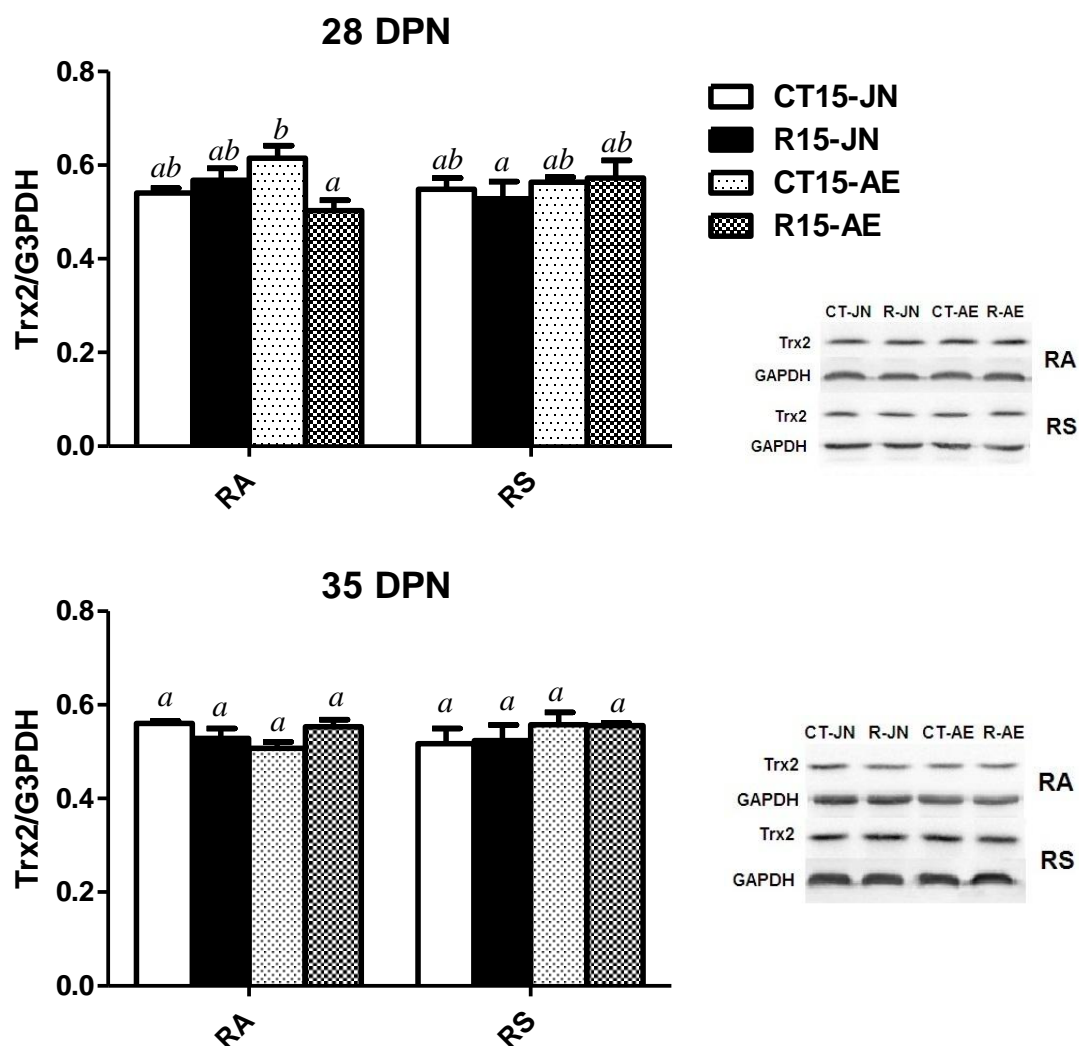


**Figura 17a.** Niveles de Trx2 en el HC. Gráfico superior: animales evaluados a los 28 DPN; Gráfico inferior: animales evaluados a los 35 DPN. CT7-JN: Control a los 7 DPN, jaula normal; R7-JN: Ruido a los 7 DPN, jaula normal; CT7-AE: Control a los 7 DPN, ambiente enriquecido; R7-AE: Ruido a los 7 DPN, ambiente enriquecido; RA: Ruido agudo; RS: Ruido sub-crónico. Letras distintas (a,b,c) simbolizan diferencias significativas con  $p < 0.05$ . Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM de los niveles de Trx2 en el HC.

Por el contrario, no se observaron efectos principales significativos en animales expuestos a los 15 DPN y evaluados a los 28 DPN (Figura 17b, ANOVA de tres vías,  $F_{7,34} = 1,34$ , NS). Sin embargo, dado que se encontró una interacción significativa entre la exposición, el alojamiento y el esquema ( $F_{1,34} = 4,43$ ,  $p < 0,05$ ), se realizó un análisis de efecto simple. Los resultados muestran que si bien no se indujeron cambios en las ratas alojadas para ninguna de las condiciones ambientales (ANOVA de dos vías, JN:  $F_{3,17} = 0,40$ , NS; AE:  $F_{3,16} = 2,47$ , NS), se encontró una interacción significativa entre la exposición y esquema en ratas

alojadas en AE ( $F_{1,16} = 4,42$ ,  $p < 0,05$ ), con una disminución significativa solo en ratas expuestas a RA (comparaciones post hoc: RA,  $p < 0,05$ ; RS, NS).

Finalmente, cuando se analizaron los HC de ratas expuestas a los 15 DPN y evaluadas a los 35 DPN no se observaron diferencias significativas entre los animales expuestos al ruido y el grupo control correspondiente, en ninguno de los diferentes esquemas de exposición, tanto en condiciones de JN como de AE (figura 17b, ANOVA de tres vías,  $F_{7,32} = 0,62$ , NS).



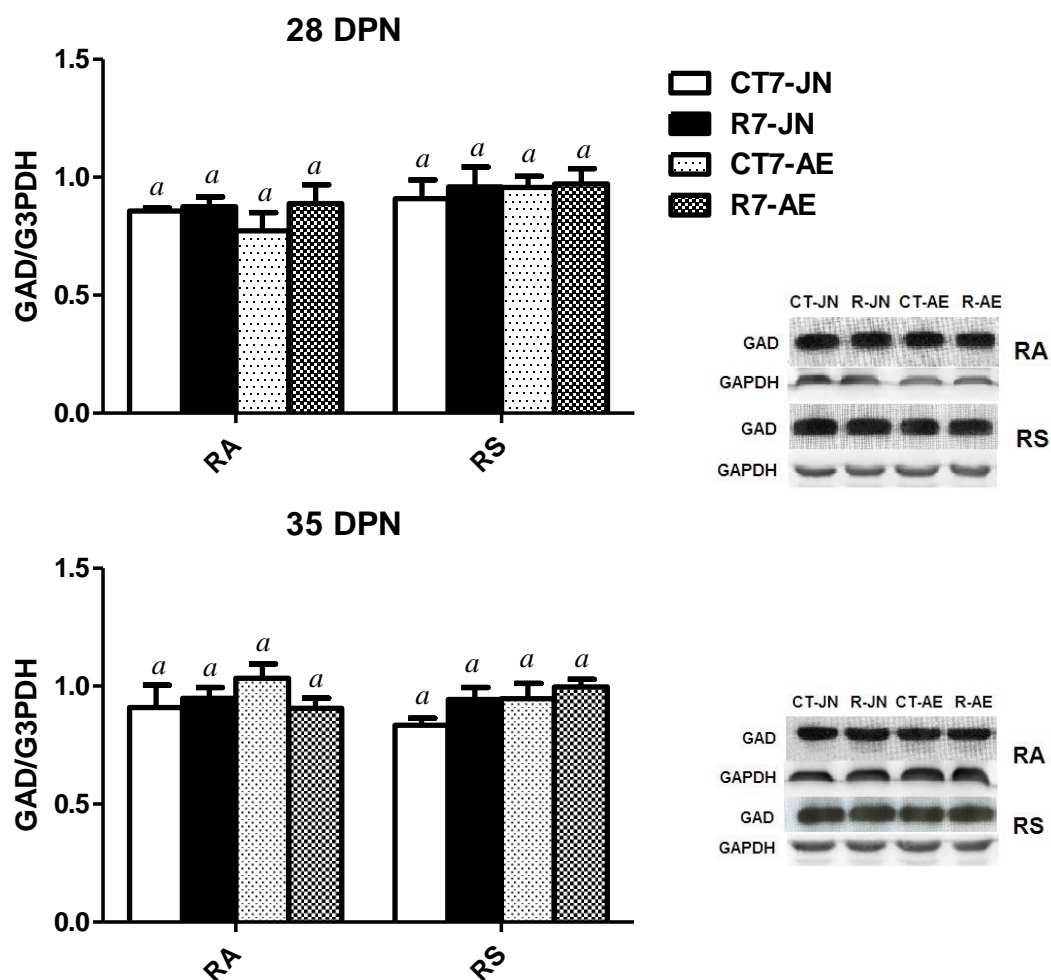
**Figura 17b.** Niveles de Trx2 en el HC. Gráfico superior: animales evaluados a los 28 DPN; Gráfico inferior: animales evaluados a los 35 DPN. CT15-JN: Control a los 15 DPN, jaula normal; R15-JN: Ruido a los 15 DPN, jaula normal; CT15-AE: Control a los 15 DPN, ambiente enriquecido; R15-AE: Ruido a los 15 DPN, ambiente enriquecido; RA: Ruido agudo; RS: Ruido sub-crónico. Letras

distintas (a,b) simbolizan diferencias significativas con  $p < 0.05$ . Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM de los niveles de Trx2 en el HC.

#### 5.4.3. Niveles de GAD 65/67 en hipocampo.

Cuando se analizaron los niveles de GAD en el HC de ratas expuestas a los 7 DPN y evaluadas a los 28 DPN no se encontraron diferencias entre los animales expuestos y el grupo control correspondiente, en ninguno de los esquemas de exposición, tanto en condiciones de JN como de AE (Figura 18a, ANOVA de tres vías,  $F_{7,20} = 0.43$ , NS).

Cuando se analizó este parámetro una semana más tarde (35 DPN), tampoco se hallaron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales (Figura 18a, ANOVA de tres vías,  $F_{7,20} = 0.90$ , NS).

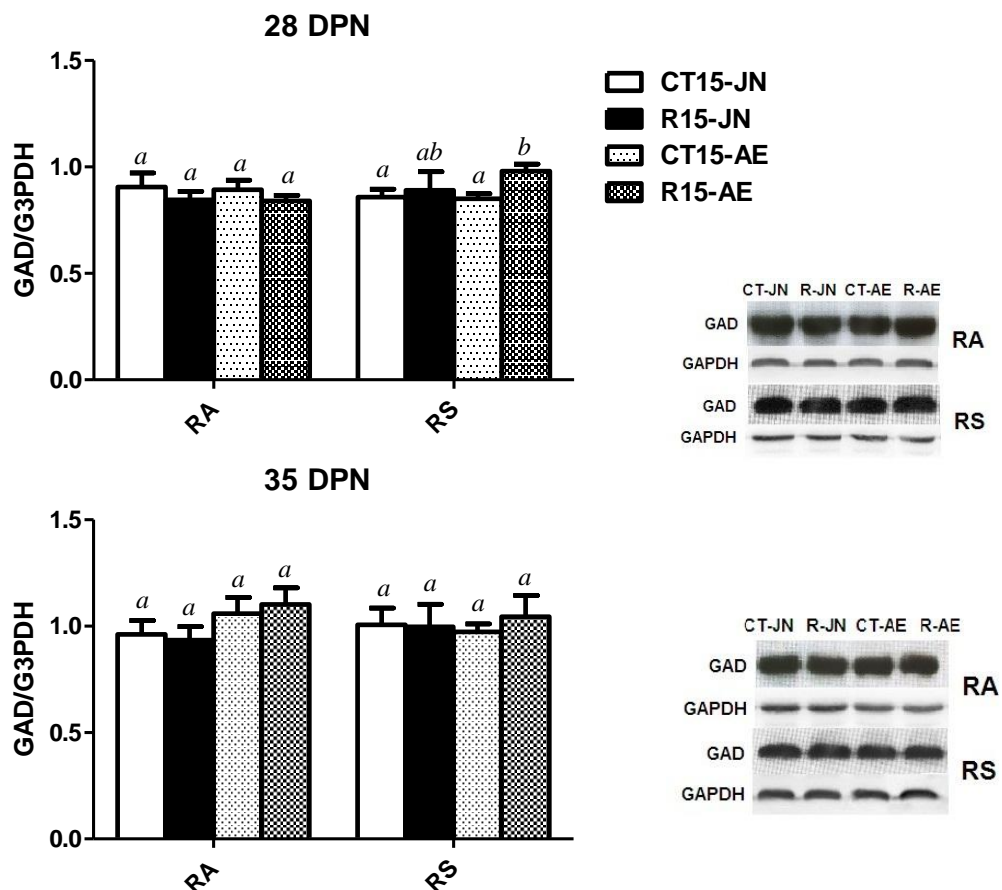


**Figura 18a.** Niveles de GAD 65/67 en el HC. Gráfico superior: animales evaluados a los 28 DPN; Gráfico inferior: animales evaluados a los 35 DPN. CT7-JN: Control a los 7 DPN, jaula normal; R7-JN: Ruido a los 7 DPN, jaula normal; CT7-AE: Control a los 7 DPN, ambiente enriquecido; R7-AE: Ruido a los 7 DPN, ambiente enriquecido; RA: Ruido agudo; RS: Ruido sub-crónico. Letras distintas simbolizan diferencias significativas con  $p < 0.05$ . Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM de los niveles de GAD 65/67 en el HC.

Por otro lado, no se observaron efectos principales significativos en animales expuestos a los 15 DPN y evaluados a los 28 DPN (Figura 18b, ANOVA de tres vías,  $F_{7,23} = 1,10$ , NS). Sin embargo, como se encontró una interacción significativa entre exposición y el esquema ( $F_{1,34} = 5,65$ ,  $p < 0,05$ ), se realizó un análisis de efecto simple (RA: ANOVA de dos vías,  $F_{3,11} = 0,51$ , NS. RS: ANOVA de dos vías,  $F_{3,11} = 1,52$ , NS. Entre factor: exposición (control o ruido),  $F_{1,11} = 4,39$ ,  $p < 0,05$ . Dentro del factor: alojamiento (JN o AE),  $F_{1,11} = 0,05$ , NS). Los resultados mostraron un aumento en los niveles de GAD65/67 en el HC de animales expuestos de acuerdo al esquema RS a los 15 DPN y evaluados a los 28 DPN luego del alojamiento en AE (comparaciones post hoc: control vs ruido: RA: JN y AE, NS; RS: JN, NS; AE,  $p < 0,05$ ).

Por último, en los HC de animales expuestos a los 15 DPN y evaluados a los 35 DPN no se observaron diferencias significativas entre los animales expuestos al ruido y el grupo control correspondiente, en ninguno de los diferentes esquemas de exposición, tanto en condiciones de JN como de AE (figura 18b, ANOVA de tres vías,  $F_{7,23} = 0,72$ , NS).





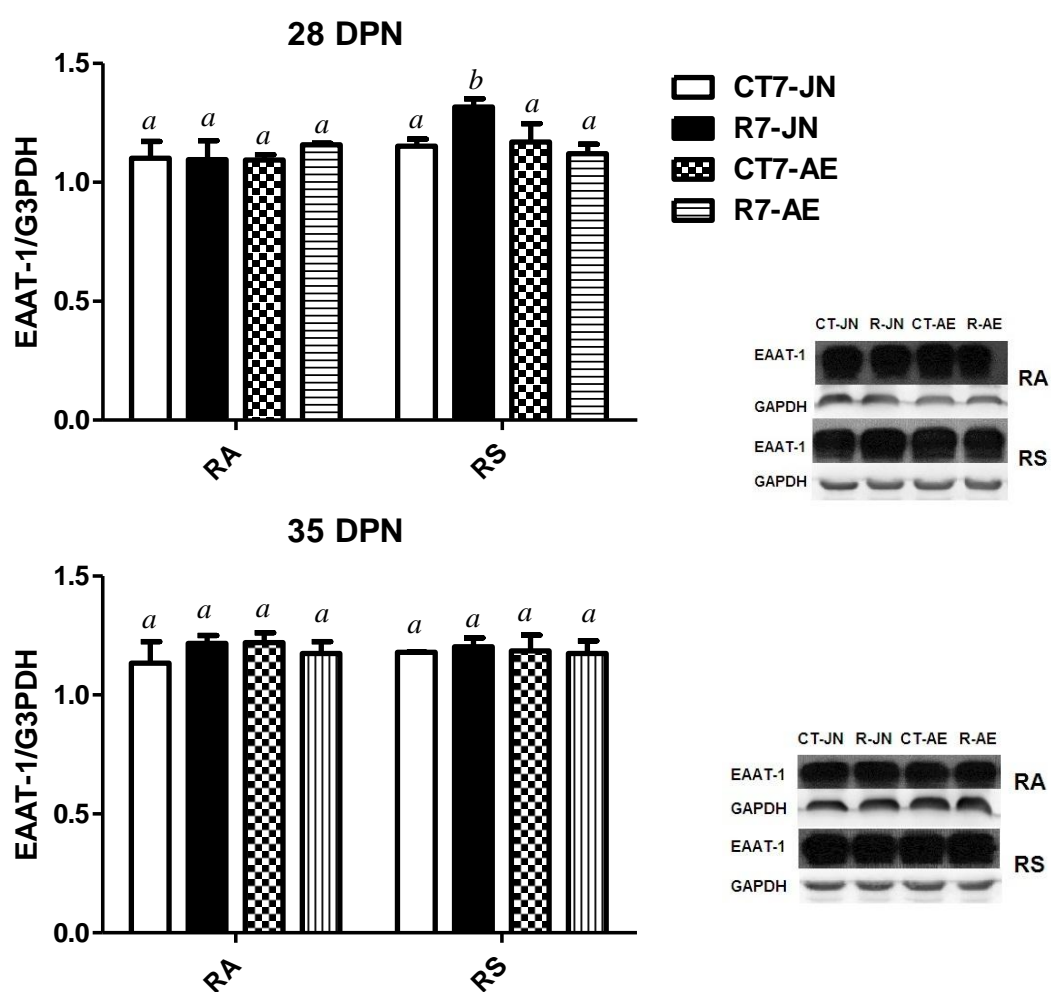
**Figura 18b.** Niveles de GAD 65/67 en el HC. Gráfico superior: animales evaluados a los 28 DPN; Gráfico inferior: animales evaluados a los 35 DPN. CT15-JN: Control a los 15 DPN, jaula normal; R15-JN: Ruido a los 15 DPN, jaula normal; CT15-AE: Control a los 15 DPN, ambiente enriquecido; R15-AE: Ruido a los 15 DPN, ambiente enriquecido; RA: Ruido agudo; RS: Ruido sub-crónico. Letras distintas (a,b) simbolizan diferencias significativas con  $p < 0.05$ . Los datos son representados el promedio  $\pm$  SEM de los niveles de GAD 65/67 en el HC.

#### 5.4.4. Niveles de EAAT-1 en hipocampo.

Cuando se evaluaron los niveles de EAAT-1 en el HC de ratas de 28 DPN expuestas a los 7 DPN, se observó un efecto principal significativo (Figura 19a, ANOVA de tres vías,  $F_{7,23} = 4,23$ ,  $p < 0,05$ ). Sin embargo, dado que se encontró una interacción significativa entre exposición y alojamiento ( $F_{1,23} = 5,39$ ,  $p < 0,05$ ), se realizó un análisis de efecto simple (ANOVA de dos vías,  $F_{3,11} = 4,23$ ,  $p < 0,05$ ; entre factores: alojamiento (JN o AE),  $F_{1,11} = 5,5$ ,  $p < 0,05$ ; dentro de factor: exposición (ruido o control),  $F_{1,11} = 1,8$ , NS). Los resultados mostraron un aumento en este parámetro en los animales expuestos a RS en comparación con los animales controles cuando se alojaron en JN, sin encontrarse diferencias entre los

animales alojados en AE. En cambio, los animales expuestos a RA no presentaron cambios en los niveles de EAAT-1 (comparaciones post-hoc: RA: JN y AE, NS; RS: JN:  $p < 0,05$ , AE, NS).

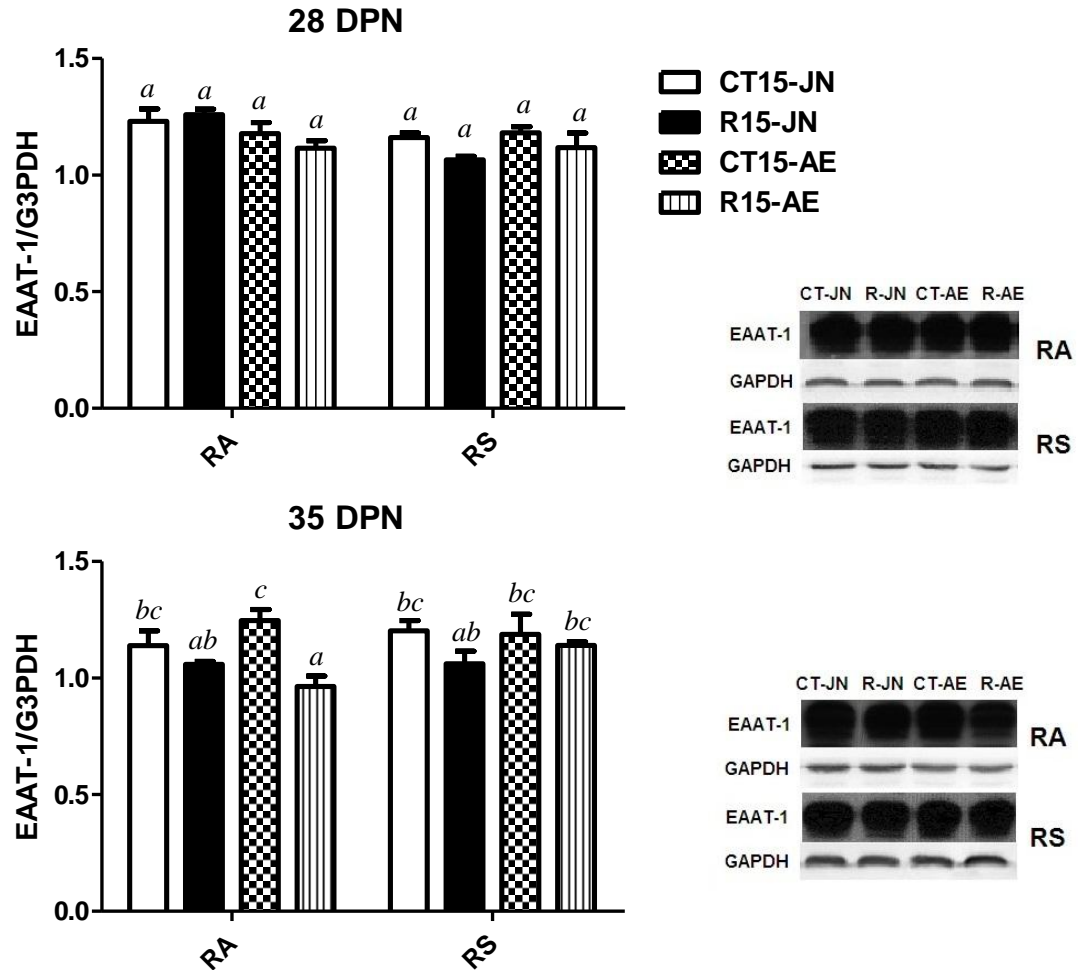
Cuando se evaluaron los niveles de EAAT-1 a los 35 DPN, no se observaron diferencias en este parámetro entre los animales expuestos al ruido y el grupo control correspondiente, en ninguno de los diferentes esquemas de exposición, tanto en condiciones de JN como de AE (figura 19a, ANOVA de tres vías,  $F_{7,18} = 0,52$ , NS).



**Figura 19a.** Niveles de EAAT-1 en el HC. Gráfico superior: animales evaluados a los 28 DPN; Gráfico inferior: animales evaluados a los 35 DPN. CT7-JN: Control a los 7 DPN, jaula normal; R7-JN: Ruido a los 7 DPN, jaula normal; CT7-AE: Control a los 7 DPN, ambiente enriquecido; R7-AE: Ruido a los 7 DPN, ambiente enriquecido; RA: Ruido agudo; RS: Ruido sub-crónico. Letras distintas simbolizan diferencias significativas con  $p < 0.05$ . Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM de los niveles de EAAT-1 en HC.

Por otro lado, se estudiaron los efectos de la exposición a los 15 DPN en los niveles de EAAT-1 en el HC de animales de 28 DPN y no se observó un efecto principal significativo (Figura 18b, ANOVA de tres vías,  $F_{7,21} = 2,81$ , NS).

Finalmente, cuando se evaluaron los niveles de EAAT-1 en el HC de ratas de 35 DPN expuestas a los 15 DPN, se observó un efecto principal significativo (Figura 19b, ANOVA de tres vías,  $F_{7,22} = 2,77$ ,  $p < 0,05$ . Entre factores: exposición (control o ruido),  $F_{1,22} = 12,65$ ,  $p < 0,01$ ; alojamiento (JN o AE),  $F_{1,22} = 0,53$ , NS. Dentro de los factores: esquema (RA o RS),  $F_{1,22} = 0,83$ , NS). Los resultados mostraron una disminución en los niveles de EAAT-1 en el HC de animales expuestos a los 15 DPN de acuerdo al esquema RA y alojados en AE cuando se compararon con sus respectivos controles, sin encontrarse diferencias cuando se alojaron en JN. En cambio, no hubo diferencias significativas entre los animales expuestos a RS y sus respectivos controles (comparaciones post hoc: RA: JN, NS; AE,  $p < 0,05$ ; RS, JN y AE, NS).

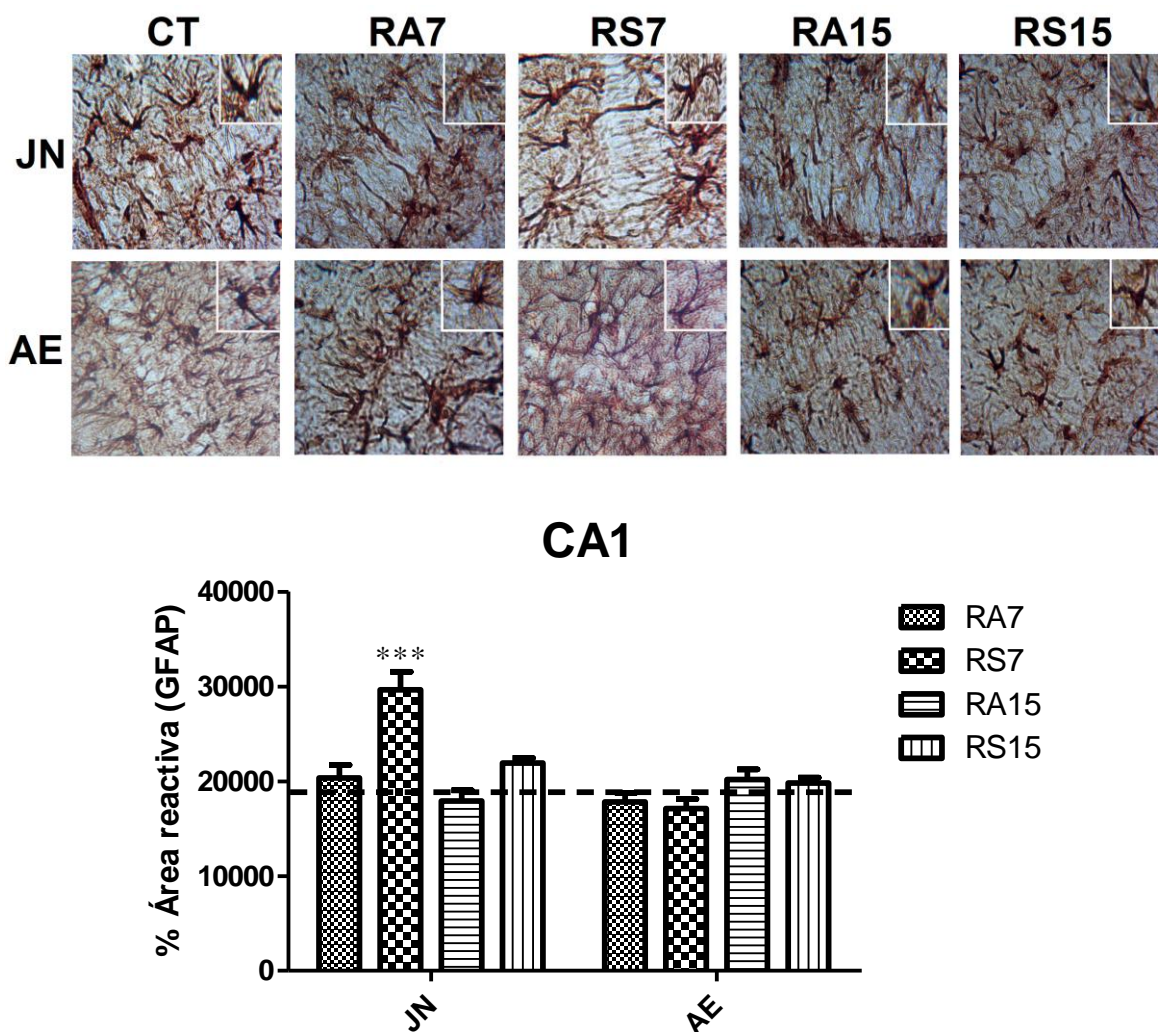


**Figura 19b.** Niveles de EAAT-1 en el HC. Gráfico superior: animales evaluados a los 28 DPN; Gráfico inferior: animales evaluados a los 35 DPN. CT15-JN: Control a los 15 DPN, jaula normal; R15-JN: Ruido a los 15 DPN, jaula normal; CT15-AE: Control a los 15 DPN, ambiente enriquecido; R15-AE: Ruido a los 15 DPN, ambiente enriquecido; RA: Ruido agudo; RS: Ruido sub-crónico. Letras distintas (a,b,c) simbolizan diferencias significativas con  $p < 0.05$ . Los datos son representados el promedio  $\pm$  SEM de los niveles de EAAT-1 en el HC.

### 5.5. Resultados inmunohistoquímica.

Cuando se comparó el área reactiva de GFAP en la subregión CA1 del HC de los animales expuestos y sus respectivos controles alojados en JN (Figura 20a), se encontró un aumento significativo en los animales expuestos a RS a los 7 DPN ( $p < 0,01$ ). En contraste, no se encontraron diferencias significativas entre los

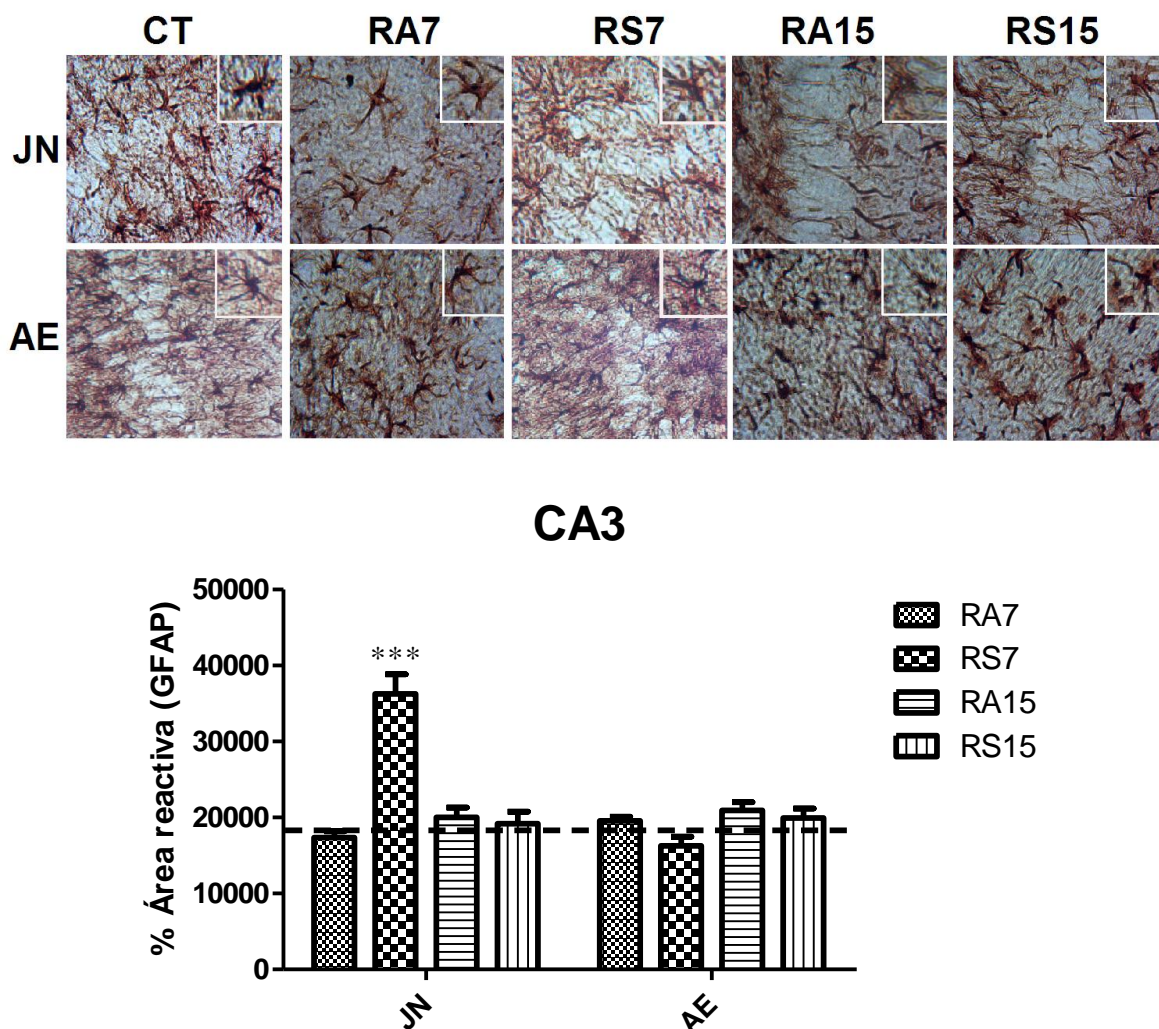
animales expuestos al ruido a las distintas edades y sus respectivos controles, para ninguno de los esquemas de exposición, cuando se alojaron en AE.



**Figura 20a.** Área reactiva de GFAP en la subregión CA1 del HC (DPN 28). Superior: Una imagen representativa de la subregión CA1 de un animal de cada tratamiento. Inferior: Gráfico que incluye los resultados de todos los animales analizados de cada tratamiento. RA7: Animales expuestos en el DPN 7; RS7: Animales expuestos entre los DPN 7 y 11; RA15: Animales expuestos en el DPN 15; RS15: Animales expuestos entre los DPN 15 y 19. JN: Jaula normal; AE: Ambiente enriquecido. \*, \*\*,  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  cuando se compara con animales control. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM del área reactiva de GFAP en la subregión CA1 del HC.

Por otra parte, se comparó el área reactiva de GFAP en la subregión CA3 del HC de los animales expuestos y sus respectivos controles alojados en JN (Figura 20b), y se encontró un aumento significativo en los animales expuestos a

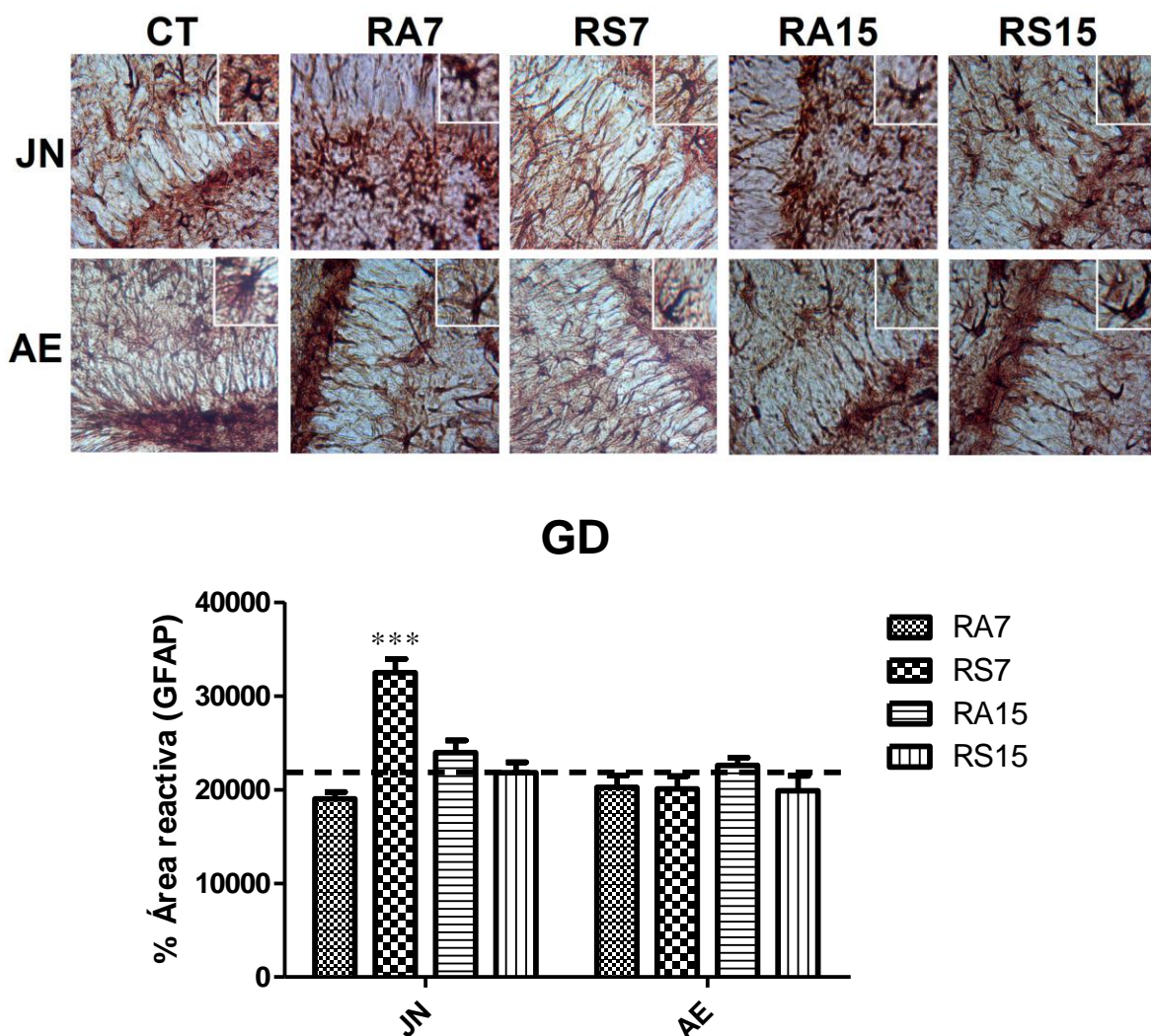
RS a los 7 DPN ( $p < 0,01$ ). Cuando se evaluó el área reactiva de GFAP de los animales expuestos al ruido a las distintas edades y sus respectivos controles cuando se alojaron en AE, no se encontraron diferencias significativas, para ninguno de los esquemas de exposición.



**Figura 20b.** Área reactiva de GFAP en la subregión CA3 del HC (DPN 28). Superior: Una imagen representativa de la subregión CA3 de un animal de cada tratamiento. Inferior: Gráfico que incluye los resultados de todos los animales analizados de cada tratamiento. RA7: Animales expuestos en el DPN 7; RS7: Animales expuestos entre los DPN 7 y 11; RA15: Animales expuestos en el DPN 15; RS15: Animales expuestos entre los DPN 15 y 19. JN: Jaula normal; AE: Ambiente enriquecido. \*, \*\*,  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  cuando se compara con animales control. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM del área reactiva de GFAP en la subregión CA3 del HC.



Por último, se comparó el área reactiva de GFAP en la subregión GD del HC de los animales expuestos y sus respectivos controles alojados en JN (Figura 20c), y se encontró un aumento significativo en los animales expuestos a RS a los 7 DPN ( $p < 0,01$ ). En contraste, no se encontraron diferencias significativas entre los animales expuestos al ruido a las distintas edades y sus respectivos controles, para ninguno de los esquemas de exposición, cuando se alojaron en AE.



**Figura 20c.** Área reactiva de GFAP en la subregión GD del HC (DPN 28). Superior: Una imagen representativa de la subregión GD de un animal de cada tratamiento. Inferior: Gráfico que incluye los resultados de todos los animales analizados de cada tratamiento. RA7: Animales expuestos en el DPN 7; RS7: Animales expuestos entre los DPN 7 y 11; RA15: Animales expuestos en el DPN 15; RS15: Animales expuestos entre los DPN 15 y 19. JN: Jaula normal; AE: Ambiente enriquecido. \*, \*\*,  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  cuando se compara con animales control. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM del área reactiva de GFAP en la subregión GD del HC.

## **5.6. Resumen de los resultados obtenidos**

A continuación, se resumen los resultados obtenidos en cuadros comparativos que incluyen: a) la comparación entre los animales expuestos al ruido y sus respectivos controles, que se alojaron en JN; b) La comparación entre los animales expuestos y sus respectivos controles, cuando se alojaron en AE, de los parámetros alterados en JN. En el punto b), cuando no se observaron diferencias en dichos parámetros, fue considerado que el AE fue capaz de prevenir dichas alteraciones; por el contrario, cuando los cambios seguían presentes, se consideró que no lo fue.

### **a) Resumen de resultados los potenciales evocados auditivos**

No se observaron diferencias significativas en la ABR de los animales expuestos al ruido en comparación con los animales controles, alojados tanto en JN como en AE.

### **b) Resultados de las pruebas de conducta**

#### **Comparación entre animales expuestos y controles alojados en JN.**

<b>Parámetro evaluado a los 28 DPN</b>	<b>RA-7</b>	<b>RS-7</b>	<b>RA-15</b>	<b>RS-15</b>
Memoria Asociativa (T2/T1)	--	↑	↑	--
Memoria Habitación (Líneas cruzadas T1 y T2)	--	--	↓	--
Actividad Exploratoria (Elevaciones)	↑	--	--	↑
Comp. Rel. Ansiedad (Latencia al BA)	↓	--	↑	↓
Comp. Rel. Ansiedad (Número incursiones BA)	↑	--	↓	--
Evaluación de riesgos (% de HD)	↑	--	--	--
Evaluación de riesgos (% de SAP)	--	--	--	--

**Cuadro 1.** Resumen de cambios conductuales de ratas expuestas al ruido respecto a sus controles de JN (28 DPN). Se indica con “↑” cuando se produjo un aumento significativo en ese parámetro y “↓” para indicar una disminución. RA-7: Ruido agudo a los 7 DPN; RS-7: Ruido sub-agudo a los 7 DPN; RA-15: Ruido agudo a los 15 DPN; RS-15: Ruido sub-agudo a los 15 DPN.



Parámetro evaluado a los 35 DPN	RA-7	RS-7	RA-15	RS-15
Memoria Asociativa (T2/T1)	--	--	--	--
Memoria Habitación (Líneas cruzadas T1 y T2)	--	--	--	--
Actividad Exploratoria (Elevaciones)	--	--	--	--
Comp. Rel. Ansiedad (Latencia al BA)	↓	--	↓	--
Comp. Rel. Ansiedad (Número incursiones BA)	--	--	--	--
Evaluación de riesgos (% de HD)	--	--	↓	--
Evaluación de riesgos (% de SAP)	--	--	--	--

**Cuadro 2.** Resumen de cambios conductuales de ratas expuestas al ruido respecto a sus controles de JN (35 DPN). Se indica con “↑” cuando se produjo un aumento significativo en ese parámetro y “↓” para indicar una disminución. RA-7: Ruido agudo a los 7 DPN; RS-7: Ruido sub-agudo a los 7 DPN; RA-15: Ruido agudo a los 15 DPN; RS-15: Ruido sub-agudo a los 15 DPN.

### Efectos preventivos del AE

Parámetro evaluado a los 28 DPN	Esquema de ruido	Efecto del AE
Memoria Asociativa (T2/T1)	RS-7	Previene
	RA-15	Previene
Memoria Habitación (Líneas cruzadas T1 y T2)	RA-15	Previene
Actividad Exploratoria (Elevaciones)	RA-7	Previene
	RS-15	No previene
Comp. Rel. Ansiedad (Latencia al BA)	RA-7	No previene
	RA-15	No previene
	RS-15	Previene
Comp. Rel. Ansiedad (Número incursiones BA)	RA-7	No previene
	RA-15	No previene
Evaluación de riesgos (% de HD)	RA-7	Previene

**Cuadro 3.** En este cuadro se resumen los efectos preventivos de una semana de AE, al DPN 28. En la columna “esquema de ruido” figuran los grupos experimentales que presentaron diferencias respecto a sus controles cuando se alojaron en JN. En “Efecto del AE” se indica si las alteraciones en dichos parámetros fueron prevenidas o no por el alojamiento en AE. RA-7: Ruido agudo a los 7 DPN; RS-7: Ruido sub-agudo a los 7 DPN; RA-15: Ruido agudo a los 15 DPN; RS-15: Ruido sub-agudo a los 15 DPN.

Parámetro evaluado a los 35 DPN	Esquema de ruido	Efecto del AE
Comp. Rel. Ansiedad (Latencia al BA)	RA-7	No previene
	RA-15	Previene
Evaluación de riesgos (% de HD)	RA-15	Previene

**Cuadro 4.** En este cuadro se resumen los efectos preventivos de dos semanas de AE, al DPN 35. En la columna “esquema de ruido” figuran los grupos experimentales que presentaron diferencias respecto a sus controles cuando se alojaron en JN. En “Efecto del AE” se indica si las alteraciones en dichos parámetros fueron prevenidas o no por el alojamiento en AE. RA-7: Ruido agudo a los 7 DPN; RA-15: Ruido agudo a los 15 DPN.

### c) Resumen de resultados de Western Blot

#### Comparación entre animales expuestos y controles alojados en JN

Parámetro evaluado a los 28 DPN	RA-7	RS-7	RA-15	RS-15
Trx1	↑	↑	↑	↑
Trx2	--	↑	--	--
GAD 65/67	--	--	--	--
EAAT-1	--	↑	--	--

**Cuadro 5.** Resumen de cambios en parámetros evaluados con Western Blot inducidos en ratas expuestas al ruido respecto a sus controles de JN (28 DPN). Se indica con “↑” cuando se produjo un aumento significativo en ese parámetro y “↓” para indicar una disminución. RA-7: Ruido agudo a los 7 DPN; RS-7: Ruido sub-agudo a los 7 DPN; RA-15: Ruido agudo a los 15 DPN; RS-15: Ruido sub-agudo a los 15 DPN.

Parámetro evaluado a los 35 DPN	RA-7	RS-7	RA-15	RS-15
Trx1	↓	--	--	--
Trx2	--	--	--	--
GAD 65/67	--	--	--	--
EAAT-1	--	--	--	--

**Cuadro 6.** Resumen de cambios en parámetros evaluados con Western Blot inducidos en ratas expuestas al ruido respecto a sus controles de JN (35 DPN). Se indica con “↑” cuando se produjo un aumento significativo en ese parámetro y “↓” para indicar una disminución. RA-7: Ruido agudo a los 7 DPN; RS-7: Ruido sub-agudo a los 7 DPN; RA-15: Ruido agudo a los 15 DPN; RS-15: Ruido sub-agudo a los 15 DPN.

### Efectos preventivos del AE

Todos los parámetros evaluados con la técnica de Western Blot en los que se observaron cambios entre los animales expuestos y sus respectivos controles de JN, fueron prevenidos cuando se alojaron en AE.

#### d) Resumen de resultados de las mediciones de ROS y Catalasa

#### Comparación entre animales expuestos y controles alojados en JN

	Tiempo post exposición	RA-7	RS-7	RA-15	RS-15
<b>ROS</b>	30 minutos	--	--	--	↓
	60 minutos	--	↓	--	↓
	24 horas	--	--	↓	--
	Largo plazo*	↓	↓	↑	↓
<b>Catalasa</b>	30 minutos	--	--	--	--
	60 minutos	--	--	--	--
	1 hora	--	--	--	--
	Largo plazo*	--	--	--	--

**Cuadro 7.** Resumen de cambios en los niveles de ROS y catalasa inducidos en ratas expuestas al ruido respecto a sus controles de JN. Se indica con “↑” cuando se produjo un aumento significativo en ese parámetro y “↓” para indicar una disminución. RA-7: Ruido agudo a los 7 DPN; RS-7: Ruido sub-agudo a los 7 DPN; RA-15: Ruido agudo a los 15 DPN; RS-15: Ruido sub-agudo a los 15 DPN. \*Los días post-exposición de largo plazo varían según el esquema de exposición, los animales fueron evaluados en el DPN 28.

### Efectos preventivos del AE

Los parámetros de los niveles de ROS alterados a largo plazo en animales expuestos de JN, no fueron prevenidos por el alojamiento en AE, en ninguno de los esquemas de exposición.

#### e) Resumen de resultados de inmunohistoquímica

<b>Región del HC</b>	<b>RA-7</b>	<b>RS-7</b>	<b>RA-15</b>	<b>RS-15</b>
CA1	--	↑	--	--
CA3	--	↑	--	--
GD	--	↑	--	--

**Cuadro 8.** Resumen de cambios en parámetros evaluados con inmunohistoquímica inducidos en ratas expuestas al ruido respecto a sus controles de JN. Se indica con “↑” cuando se produjo un aumento significativo en ese parámetro y “↓” para indicar una disminución. RA-7: Ruido agudo a los 7 DPN; RS-7: Ruido sub-agudo a los 7 DPN; RA-15: Ruido agudo a los 15 DPN; RS-15: Ruido sub-agudo a los 15 DPN.

#### Efectos preventivos del AE

El aumento de los niveles de GFAP observados tanto en CA1, CA3 como GD del HC en los animales expuestos a RS7 alojados en JN, fueron prevenidos cuando los animales se alojaron en AE.



## 6. Discusión

## **6. Discusión**

### **6.1. Función auditiva**

La exposición al ruido es una de las principales causas de pérdida de la función auditiva. Se ha reportado que la misma puede generar lesiones en las estructuras auditivas periféricas, dañando principalmente a las células ciliares y las células de soporte de la cóclea, así como también a las células del ganglio espiral del nervio auditivo (Saunders et al., 1985; Henderson et al., 2006; Ohlemiller, 2008). En animales adultos, la exposición a altas intensidades de ruido ( $> 105$  dB) sería capaz de generar daños estructurales en dichas células, provocando pérdida auditiva y un aumento del umbral auditivo de forma permanente (Gourévitch et al., 2014). Por el contrario, la exposición a ruido moderado (80-105 dB) tendría efectos transitorios en el umbral auditivo, dejando las células ciliares intactas, aunque podría generar una pérdida de las terminaciones nerviosas y provocar una degeneración retardada del nervio coclear (Kujawa & Liberman, 2009).

La exposición al ruido durante el desarrollo también puede generar consecuencias en el sistema auditivo a largo plazo, las cuales serían distintas a las halladas en adultos, dado el periodo de mayor sensibilidad a los estímulos ambientales (Freeman et al., 1999; Zhang et al., 2002). El sistema auditivo de las ratas se vuelve sensible a los sonidos del ambiente entre los días 10 y 12 postnatales y a partir de este momento se considera que comienza un PC de plasticidad neuronal durante el cual el sistema se refina y desarrolla hacia el estado maduro (Bures et al., 2010).

En el presente trabajo se evaluó la exposición al ruido moderado a diferentes edades y durante diferentes periodos de tiempo. Los grupos expuestos a los 7 DPN (RA) y entre el DPN 7 y 11 (RS) son animales que aún tienen una vía auditiva inmadura. Por el contrario, las ratas expuestas a los 15 DPN (RA) y entre el DPN 15 y el 19 ya contaban con una vía auditiva madura. Dado que no se encontraron alteraciones de los umbrales auditivos en ninguno de los grupos expuestos al ruido, presentando ABRs similares a los de los animales no

expuestos, se podría sugerir que la intensidad de ruido moderada (menor a 100 dB) utilizada no sería suficiente para provocar cambios en los umbrales auditivos que puedan ser detectados a las cuatro semanas de vida. En relación a las ratas expuestas durante la primera semana de vida, estos resultados son consistentes con el hecho de que estas ratas no poseen una vía auditiva madura al momento de la exposición y, por tal motivo, si la vía auditiva no estuvo activa, no podría verse afectada por la exposición al ruido. Por el contrario, en las ratas expuestas una semana más tarde, que ya tenían la vía auditiva madura, la intensidad del ruido parecería no haber sido lo suficientemente elevada como para generar un efecto sobre los umbrales auditivos. De todas formas, no se puede descartar el hecho de que el ruido haya tenido consecuencias en la ABR de forma transitoria antes de la edad en la que se evaluó a los animales, dado que no se midieron estas respuestas a edades más tempranas post-exposición.

Uran et al. (2014) evaluaron las ABRs en el mismo modelo de exposición a R15-RA y en un modelo de RS15 más prolongado (15 días de exposición). A las 4 semanas se observó un aumento en la ABR, siendo mayor en el caso de los animales expuestos a ruido sub-agudo. El hecho que no se hayan encontrado cambios en los animales expuestos por 5 días, sugiere que se requerirían más exposiciones para poder causar alteraciones en la ABR.

Por otro lado, dada la correlación hallada entre las alteraciones del comportamiento y el aumento de los umbrales auditivos presentes en algunos de los trabajos citados (Uran et al., 2014; Liu et al., 2016), se planteó la posibilidad de que los cambios en el comportamiento de los animales expuestos podría deberse, al menos en parte, al ingreso anormal de las señales auditivas al cerebro. Dado que en el presente trabajo se hallaron modificaciones en distintos parámetros conductuales, sin encontrarse cambios en las ABRs, dicha hipótesis podría ser descartada.

Finalmente, si bien las ratas expuestas al ruido de los diferentes grupos experimentales no mostraron cambios en las ABRs al evaluarlas a las 4 semanas, no se puede descartar la posibilidad de que se hayan producido alteraciones estructurales en la vía auditiva, dado que no fueron evaluadas. En este sentido,

algunos estudios reportaron que la exposición al ruido moderado puede causar daños estructurales, como por ejemplo, en las terminales nerviosas aferentes, sin que se detecten cambios significativos en los umbrales auditivos, aunque esto se observó con intensidades más elevadas que las utilizadas en este trabajo (Kujawa & Liberman, 2009; Plack et al., 2014).

## 6.2. Comportamiento

### 6.2.1. Análisis de los efectos de la exposición al ruido a los 7 y 15 DPN sobre el comportamiento de animales de 28 DPN

#### 6.2.1.1. Memoria

Existen diferentes tipos de aprendizajes entre los que se encuentran los de tipo no-asociativo (como la memoria de habituación) y asociativo (como el condicionamiento de miedo). Estos aprendizajes llevan a la formación de memorias distintas, que varían en los mecanismos necesarios para su formación (Vianna et al., 2000). La habituación consiste en cambios en el comportamiento como respuesta a la repetición o la exposición continua a un estímulo novedoso. Por otro lado, el condicionamiento de miedo implica una conexión predictiva entre un evento determinado y un estímulo. Tanto la memoria del condicionamiento de miedo contextual, como la memoria de habituación a un ambiente novedoso, dependen del buen funcionamiento de los procesos que se llevan a cabo en el HC (Vianna et al., 2000; Wright et al., 2004; Leussis & Bolivar, 2006).

El miedo es la emoción más ampliamente estudiada y la forma en que se ha investigado más a menudo es con pruebas de condicionamiento de miedo (LeDoux, 2012). Se considera que el miedo es un estado consciente que consta de componentes asociativos y no asociativos, causados por la exposición a amenazas reales o imaginarias (Costanzi et al., 2018). Además, el miedo puede ser distinguido de la ansiedad ya que ocurre en respuesta a amenazas percibidas



como iminentes, mientras que la ansiedad se produciría en respuesta a amenazas potenciales o sostenidas (Izquierdo et al., 2016). Este tipo de aprendizaje representa las muchas situaciones similares en humanos en las que los estímulos inicialmente neutrales se vuelven amenazantes a través del emparejamiento con otros estímulos y generan miedo, una emoción que guía gran parte del comportamiento y es crucial para la supervivencia.

El condicionamiento de miedo contextual, implica una respuesta de miedo como consecuencia de la asociación entre un estímulo aversivo (shock eléctrico) y el ingreso al compartimiento del aparato en donde el animal recibió dicho estímulo. En el presente trabajo no se encontraron déficits en este tipo de memoria: todos los grupos expuestos al ruido aprendieron a evitar el compartimiento oscuro. Sin embargo, se observó un aumento en el cociente de la relación T2/T1 en las ratas expuestas a RS7 y RA15. En otras palabras, si bien todos los animales demoraron más tiempo en pasar al compartimiento oscuro en la sesión de retención, los animales expuestos a RS7 y RA15 demoraron mucho más tiempo y muchos de ellos nunca pasaron. El aumento del T2 en esta prueba es interpretado como un indicador de una mejor memoria asociativa (Atucha & Roozendaal, 2015). A partir de varios estudios, se ha demostrado que la adquisición de este tipo de memoria implica la codificación de información con el objeto de que se pueda producir de forma correcta la asociación entre una ubicación dentro del aparato y el estímulo del shock eléctrico. Esta adquisición implica varios procesos complejos y la participación y coordinación de diferentes estructuras cerebrales (Izquierdo et al., 2006; Malin & McGaugh, 2006; Roozendaal & McGaugh, 2012). Es decir que el aumento del T2 que presentan estos animales implicaría una representación más exacta o detallada de la experiencia que tuvieron durante el entrenamiento (Atucha & Roozendaal, 2015). En este sentido, parecería que la exposición temprana al ruido según los esquemas mencionados, tendría efectos positivos en la memoria asociativa en ratas de 28 DPN.

Por otro lado, existe otra posible explicación sobre estos resultados. El hecho de que los animales de los grupos RS7 y RA15 presentaron un cociente más elevado, podría no estar reflejando una mejoría de la memoria sino un

aumento del miedo. En este sentido, todos los grupos mostraron retención de la memoria asociativa dado que el T2 fue mayor al T1, demostrando que no habría un problema en la adquisición de la memoria. Es posible que los animales de los tratamientos RS7 y RA15 permanecieran por más tiempo en el compartimiento iluminado no porque recordasen mejor, sino porque tuvieron una mayor activación emocional (es decir, el miedo) que llevó a una respuesta de evitación más prolongada. En consecuencia, lo que podría ser interpretado como un mejor desempeño en la prueba de EI, podría implicar, en cambio, una respuesta de miedo excesiva y posiblemente “desadaptativa” en otros contextos (Ponomarev et al., 2010; Costanzi et al., 2018). Si bien el condicionamiento de miedo es fundamental para la supervivencia de los individuos, dado que permite aprender sobre aquellos estímulos que predicen potenciales peligros, el ambiente es un medio de cambio constante ante el cual hace falta tener cierta flexibilidad. Más aún, para que se produzca una respuesta de miedo adaptativa, la respuesta defensiva debería ser proporcional al estímulo que la generó; en cambio, si la respuesta es excesiva y no disminuye con el tiempo, podría interferir con el funcionamiento normal del individuo. En humanos, las respuestas de miedo incrementadas suelen asociarse con diferentes trastornos de ansiedad (Michael et al., 2007; Ponomarev et al., 2010; Shin & Liberzon, 2010; Hoffman et al., 2016).

En cuanto a la memoria de habituación, O'Keefe y Nadel (1978) plantean la teoría del "mapa cognitivo": cuando un roedor es colocado en un ambiente novedoso, comienza a formar una representación interna de la información espacial que lo rodea. Una vez que este mapa hipocampal se encuentra "completo", el animal disminuye la exploración del ambiente y se puede considerar que se habituó al nuevo contexto (Leussis & Bolívar, 2006). En el presente trabajo, se encontró un déficit en la memoria de habituación solo en el grupo expuesto a RA15, sin encontrarse cambios en los animales expuestos de acuerdo a los otros esquemas. En la segunda sesión, estos animales mostraron una exploración horizontal similar a la de la primera, sin observarse la disminución esperable de este comportamiento como índice de la integridad de memoria de habituación a corto plazo. Dado que los cambios se produjeron sólo en este grupo, se podría

sugerir que los animales de 15 DPN serían más vulnerables que los más jóvenes a trastornos en la habituación y que una sola exposición sería necesaria para generar la alteración. Además, se podría postular que cuando el animal de 15 DPN es expuesto repetidamente, se gatillarían mecanismos compensatorios que normalizarían esta memoria.

Según Leussis et al. (2000), hay una serie de variables que pueden afectar al comportamiento exploratorio y, en consecuencia, a la habituación, entre las que se encuentra la ansiedad por la novedad. Más aún, se ha planteado que existe una estrecha relación entre la ansiedad y la memoria, ya que los mecanismos implicados en la formación de la memoria estarían regulados por mecanismos asociados al estrés y la ansiedad (Izquierdo & Medina, 1997; Salomons et al., 2012). El grupo RA15, mostró un incremento de los comportamientos relacionados a la ansiedad que se evaluaron en el LCE, el cual consiste en un entorno novedoso que genera un conflicto natural entre el impulso a explorar y la tendencia a evitar un área potencialmente peligrosa. Es posible que el aumento de los comportamientos relacionados a la ansiedad que presentan estos animales, esté asociado a un déficit de la memoria, como se encontró en otros estudios (Salomons et al., 2012; Barzegar et al., 2014; Venero et al., 2018). Si bien niveles bajos o moderados de ansiedad podrían ser positivos para el aprendizaje y la memoria, se ha mostrado que altos niveles podrían generar un déficit (Silva et al., 2000). Además, en concordancia con esta hipótesis, las ratas expuestas a RA15 podrían tener un aumento de la respuesta del miedo, lo cual implicaría que estos animales tendrían una mayor reactividad emocional. Finalmente, en contraposición a los resultados hallados, se ha sugerido que menores niveles de ansiedad podrían favorecer la adaptabilidad de los animales a un nuevo contexto y provocar una habituación más rápida (Uran et al., 2010).

Los resultados obtenidos en este trabajo difieren de los encontrados en otros estudios. En relación a la memoria de habituación, Uran et al. (2014) encontraron cambios en las ratas expuestas al ruido solo en la memoria a largo término (24 horas luego del entrenamiento), sin encontrarse diferencias a corto término. Además, encontraron un déficit en la memoria asociativa de miedo en los

animales expuestos a RS durante 15 días, sin encontrarse cambios en el grupo expuesto a RA. Por otro lado, la memoria asociativa del miedo fue estudiada también en otros modelos de ruido (Cheng et al., 2011; Wang et al., 2016), en los cuales se encontraron alteraciones en la memoria a largo término. Considerando estos trabajos, parecería que la exposición prolongada al ruido (mayor a 15 días) sería capaz de provocar un déficit en la memoria asociativa del miedo a largo término. Lamentablemente, en el presente trabajo se tuvo que descartar la evaluación de la memoria a largo término en la prueba de EI, dado que el protocolo utilizado generó mucha variabilidad en los animales controles, por lo que no se lo pudo considerar como válido. De otro modo, hubiera sido interesante evaluar si períodos más cortos de exposición serían capaces de generar alteraciones en la memoria a largo término.

Se ha mostrado que para la formación de estas memorias contextuales es necesario el correcto funcionamiento del HC, así como de otras estructuras del SNC (Sargolini et al., 1999; Barros et al., 2000; Alonso et al., 2005; Leussis et al., 2006; Izquierdo et al., 2016). Por este motivo, si bien ambos tipos de aprendizaje dependen de algunas estructuras en común, como el HC, no se puede descartar el hecho de que la exposición al ruido pudiera afectar otras estructuras implicadas, lo que podría explicar por qué en la memoria de habituación se halló un déficit mientras que la memoria asociativa estaría conservada o aún “mejorada”. Por otra parte, otro factor a tener en consideración son los efectos moduladores del aumento de la respuesta emocional sobre la memoria. Se ha planteado que la amígdala tendría un rol fundamental en la modulación de diferentes tipos de memoria, el cual estaría estrechamente relacionado con la función hormonal (Packard & Cahill, 2001; Schwabe & Wolf, 2012; Schwabe et al., 2012). Finalmente, para ambos tipos de aprendizaje se destaca la importancia de la actividad exploratoria de los animales, dado que permite recolectar información relevante sobre el entorno, para poder responder de manera adecuada a las exigencias del ambiente.

#### 6.2.1.2. Comportamiento relacionado a la ansiedad y defensivo

La ansiedad es normalmente definida como un estado emocional negativo asociado con la percepción de un peligro potencial o ambiguo. Al igual que el miedo, es una respuesta defensiva, pero se caracteriza por el sentimiento de aprehensión, incertidumbre, preocupación, inquietud o tensión derivadas de la anticipación de una posible amenaza (Ennaceur, 2014). Cuando se produce ansiedad, tanto los humanos como los individuos de otras especies (para las cuales se usa el término “conducta relacionada a la ansiedad”), se enfrentan a una situación ambigua en la que no pueden evitar o acercarse al estímulo percibido como amenaza. Además, las respuestas conductuales defensivas que se producen cuando hay ansiedad, permiten evitar o reducir el daño y así garantizar la adaptación al entorno y la supervivencia del organismo. En los humanos, sin embargo, el miedo excesivo y/o la ansiedad crónica traen grandes consecuencias negativas para los individuos afectados y, debido a su alta prevalencia, para la sociedad en general (Tovote et al., 2017).

El LCE es una prueba ampliamente utilizada para evaluar el comportamiento relacionado a la ansiedad en roedores. En el presente trabajo se observó un aumento del comportamiento relacionado a la ansiedad en animales expuestos a RA15 y una disminución en las ratas expuestas a RA7. Estos animales mostraron cambios en la latencia para salir al BA y en el número de incursiones al mismo, completamente opuestos dependiendo de la edad en que fueron expuestos al ruido. En este sentido, tendría relevancia la edad del animal al momento de la exposición a la injuria, pudiendo ésta alterar de forma distinta al desarrollo del SNC y la respuesta comportamental del animal ante situaciones potencialmente peligrosas en el futuro. Por otro lado, los animales expuestos a RS15, presentaron cambios en uno solo de los parámetros evaluados (latencia al BA), por lo que no habría suficiente evidencia para plantear alteraciones del comportamiento relacionado a la ansiedad en este grupo de animales. Una vez más, la exposición repetida podría estar gatillando respuestas adaptativas

compensatorias tendientes a normalizar la conducta relacionada a la ansiedad y memorias relacionadas.

Algunos autores investigaron los efectos del ruido en el comportamiento relacionado a la ansiedad, encontrando tanto una disminución (Eraslan et al., 2015) como un aumento (Angrini & Leslie, 2012; Naqvi et al., 2012) de estos comportamientos. Si bien la intensidad del ruido y la exposición diaria fue bastante similar en estos trabajos (100 dB, 4 horas), varió considerablemente el tiempo de exposición desde 15 días a 2 meses, lo cual podría ser una variable determinante en el desarrollo de las alteraciones conductuales, ya sea generando un aumento o una disminución. En relación al presente trabajo, esta variable también sería fundamental ya que las alteraciones en el comportamiento relacionado a la ansiedad se detectaron en los animales expuestos a RA y no a RS. Más aún, Eraslan et al. (2015) encontraron una respuesta comportamental diferente en los animales expuestos según el tipo de exposición utilizada, habiendo un aumento del comportamiento relacionado a la ansiedad en las ratas expuestas a RA y una disminución para el grupo expuesto de forma crónica (30 días consecutivos). Finalmente, la edad de exposición también parecería ser clave para la generación de este tipo de alteraciones. Los únicos trabajos en donde se estudiaron los efectos de la exposición al ruido durante el desarrollo sobre el comportamiento relacionado a la ansiedad son los de Uran et al. (2010, 2014), en los cuales se reportó que los animales expuestos durante 15 días consecutivos tuvieron una reducción en este tipo de comportamientos, sin encontrarse diferencias en el grupo expuesto a RA15. En resumen, los estudios hallados en la bibliografía muestran que el ruido podría generar alteraciones en el comportamiento relacionado a la ansiedad, habiendo mucha variabilidad entre los diferentes trabajos, probablemente a causa de los diferentes protocolos de exposición. Los hallazgos del presente trabajo demostrarían que una única exposición al ruido durante el desarrollo sería suficiente para provocar alteraciones en estos comportamientos a largo término y que la edad de los animales al momento de dicha exposición es determinante para el futuro desarrollo conductual del animal.

En situaciones potencialmente peligrosas los animales despliegan una serie de comportamientos defensivos, los cuales disminuyen las posibilidades de ser dañados (McFarland, 1987). Dentro de este repertorio se encuentran los comportamientos de evaluación de riesgos. Estos comportamientos resultan útiles para obtener información sobre situaciones potencialmente peligrosas y su análisis suele ser relevante para detectar sutiles diferencias en relación a la respuesta de ansiedad (Carobrez & Bertoglio, 2005; Kyriakou et al., 2017). Además, se ha sugerido que estos comportamientos podrían parecerse a algunas de las respuestas conductuales que presentan humanos con trastornos de ansiedad (Wall, 2001). En este trabajo se evaluaron dos tipos de comportamientos de evaluación de riesgos: el HD y el SAP.

El HD puede ser considerado como un intento de encontrar una ruta de escape de un ambiente potencialmente peligroso, como puede ser el LCE (Ennaceur, 2014). En este trabajo, se produjo un aumento del HD únicamente en las ratas expuestas a RA7. Según reportaron varios estudios, un aumento en este parámetro suele asociarse con una disminución de las conductas relacionadas a la ansiedad (Cole & Rodgers, 1995; Rodgers & Johnson, 1995; Wall, 2001), como se observó en estas ratas a partir del análisis de los otros parámetros evaluados en el LCE. Por otro lado, el SAP está asociado con el aprendizaje sobre posibles estímulos amenazantes, la reticencia a abandonar las áreas protegidas y refleja el conflicto de aproximación/evasión (Ennaceur, 2014). No se encontraron diferencias significativas en este parámetro en ninguno de los grupos de animales expuestos. Si bien la evaluación de este parámetro resultó útil en muchos modelos, también se ha reportado que no siempre concuerda con los parámetros espaciales que indican un aumento o una disminución de la ansiedad (Shepherd, et al., 1994; Heisler et al., 1998; Setem, 1999; Silva & Brandão; Kim et al., 2002; Ennaceur, 2014). En suma, si bien en diferentes modelos de ansiedad el HD y el SAP resultaron parámetros relevantes para obtener información, e incluso en algunos de ellos resultaron más sensibles que los parámetros espacio-temporales, en el presente trabajo fueron los parámetros menos sensibles a los efectos de la exposición temprana al ruido.

Por último, se ha propuesto que existe una fuerte relación entre el comportamiento relacionado a la ansiedad y la actividad exploratoria de los animales. En base a los resultados de algunos estudios, se planteó que a medida que disminuye el comportamiento relacionado a la ansiedad, los animales aumentan la exploración del entorno (Costall et al., 1987, 1989; Escorihuela et al., 1999; Belzung & Griebel, 2001; Lever et al., 2006). En este trabajo, los animales expuestos a RA7 y RS15 mostraron un aumento de la actividad exploratoria vertical, resultado similar al encontrado por Pan et al. (2006). Estos cambios de la actividad exploratoria se correlacionan con los cambios en la latencia al BA: cuando hay una menor latencia al BA, aumenta la actividad exploratoria. En otras palabras, cuando disminuye el comportamiento relacionado a la ansiedad, aumenta la exploración. Como se mencionó anteriormente, la exploración es importante para obtener información relevante sobre el entorno y en base a la nueva información adquirida, responder de manera adecuada a sus exigencias. Un aumento de la actividad exploratoria y, por ende, de la recolección de información proveniente del ambiente, podría favorecer la habituación y la adaptabilidad de estos animales expuestos (RA7 y RS15), como se observó en la prueba de CA (Figuras 13a y 13b). Sin embargo, una disminución del comportamiento relacionado a la ansiedad, como presentaron las ratas expuestas a RA7, podría traer consecuencias negativas ya que estos animales serían menos cautelosos y podrían exponerse más a potenciales peligros como, por ejemplo, con sus intentos de hallar una ruta de escape (dado el incremento de HDs). Nuevamente, la falta de cambio en la actividad exploratoria en el grupo RS7 podría deberse a posibles respuestas tendientes a compensar alteraciones para mantener lo que sería una conducta “normal”. En cambio, la falta de cambio en el grupo RA15 podría ser atribuida al hecho de que si bien una sola exposición sería suficiente para producir un cambio en animales más jóvenes, no alcanzaría para generar alteraciones en animales más maduros.



### 6.2.2. Una semana de ambiente enriquecido como estrategia de neuroprotección

El AE ha demostrado ser una herramienta de protección eficaz contra diferentes lesiones del SNC (Lores-Arnaiz et al., 2006; Baldini et al., 2013). A nivel comportamental se encontraron beneficios del AE en el aprendizaje y la memoria (Duffy et al., 2001; Schrijver et al., 2002; Frick et al., 2003; Lyst et al., 2012; Baraldi et al., 2013), así como en la normalización de comportamientos relacionados a la ansiedad y en la actividad exploratoria de los animales (Chapillon et al., 1999; Benaroya-Milshtein et al., 2004; Friske & Gammie, 2005; Lima et al., 2014). Considerando que la exposición al ruido puede generar alteraciones conductuales, como se observó en este trabajo, se evaluó la capacidad del AE para prevenir dichas alteraciones.

En el presente trabajo se encontraron alteraciones en la memoria de habituación y asociativa del miedo en los animales expuestos a RA. En el caso de las ratas expuestas y alojadas en AE durante una semana, no se hallaron estas alteraciones, lo cual mostraría la capacidad de este tipo de ambiente para prevenir las alteraciones provocadas por una temprana exposición al ruido. Se cree que la novedad, el contacto social y el ejercicio, combinados, son gratificantes para los animales y favorecen la activación, la señalización y la plasticidad de diferentes estructuras del SNC, acarreando cambios positivos para los individuos (Rebec et al., 1997; Crofton et al., 2015; Sampedro-Piquero & Begega, 2017). En el presente modelo experimental, la combinación de estos factores sería relevante para prevenir las alteraciones de la memoria que se observaron dos y tres semanas post-exposición en animales expuestos a los 15 DPN y 7 DPN, respectivamente, con tan solo una semana de alojamiento en este tipo de ambiente. Además, el AE también fue capaz de prevenir las alteraciones de los otros parámetros alterados en el grupo RA7, como son el % HD y el número de elevaciones.

En otros modelos animales se han encontrado mejoras en el aprendizaje y la memoria de animales adultos que se alojaron en AE, similares a las reportadas en este trabajo (Duffy et al., 2001; Tang et al., 2001; Schrijver et al., 2002; Kondo et al., 2012). Por ejemplo, Schrijver et al. (2002) encontraron que el AE aceleraba

la habituación inter-sesión en el CA. Por otra parte, también se reportaron mejorías en la memoria de miedo contextual con luego de dos o tres semanas de enriquecimiento (Tang et al., 2001; Kondo et al., 2012). El presente trabajo demuestra que una semana de ambiente enriquecido sería suficiente para mejorar el déficit de estos tipos de memoria en animales en desarrollo. Es posible que este corto tiempo de estimulación ambiental sea suficiente para generar estas mejoras dada la edad de los animales, que se encontraban en una etapa aún de crecimiento y de mayor sensibilidad a estímulos del ambiente (Heim & Nemeroff, 1999; Spear, 2000).

Por el contrario, una semana de AE no previno las alteraciones del comportamiento relacionado a la ansiedad de los animales expuestos a RA. Los animales alojados en AE presentaron alteraciones en la latencia al BA y el número de incursiones similares a las encontradas en las ratas de JN. Resulta importante destacar que estos comportamientos se han asociado al HC ventral (Kjelstrup et al., 2002; McHugh et al., 2004; Pentkowski et al., 2006), mientras que las funciones cognitivas de aprendizaje y memoria vinculadas con la navegación, la exploración y la locomoción, se han asociado con el HC dorsal (Moser & Moser, 1993; Bannerman et al., 1999, 2002; Fanselow & Dong, 2010). En este sentido, se podría postular que una semana de AE sería suficiente para prevenir alteraciones de los comportamientos relacionados al HC dorsal, mientras que no sería suficiente en el caso de los comportamientos asociados al HC ventral. De acuerdo con esta hipótesis, estudios recientes reportaron que el AE podría generar cambios asimétricos en las regiones ventral y dorsal del HC (Tanti et al., 2012; Tanti & Keown, 2013; Valero-Aracama et al., 2015; Zhang et al., 2018). Por ejemplo, Tanti et al. (2012) hallaron que el AE favoreció la proliferación celular en ambas regiones, pero produjo un aumento de la neurogénesis solo en el HC dorsal. Por su parte, Valero-Aracama et al. (2015), encontraron que el aumento de la excitabilidad intrínseca que produce el AE en la zona CA1 del HC, se produce principalmente en la región dorsal, lo cual se correlacionaría con una mejoría en el aprendizaje y la memoria. En consecuencia, la falta de prevención de las conductas relacionadas a la ansiedad apoya lo reportado por estos autores.

### 6.2.3. El ambiente enriquecido podría favorecer la expresión de ciertos fenotipos conductuales

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar el AE como estrategia de neuroprotección ante los efectos de una exposición temprana al ruido y, como se observó en la sección de resultados, una semana de AE sería suficiente para prevenir algunas de las alteraciones en el comportamiento. Sin embargo, en algunos casos, se observó una alteración del comportamiento de los animales expuestos al ruido solo cuando se alojaron en AE, sin encontrarse diferencias entre los animales que se hospedaron en JN. Por ejemplo, tanto las ratas expuestas a RA7 como a RS15, mostraron una mejor performance en la prueba de EI cuando se alojaron en el AE (Figuras 12a y 12b). Como se discutió en el apartado “Memoria” (6.2.1.1), el aumento de la relación T2/T1 podría deberse a una mejor memoria o a un aumento de la respuesta de miedo condicionado, pudiéndose interpretar como un efecto positivo o negativo de la exposición al ruido, dependiendo de las exigencias del ambiente en el que se encuentre el animal. Considerando estos resultados, se podría plantear que los cuatro protocolos de exposición al ruido serían capaces de generar cambios en la memoria asociativa del miedo. Para dos de los tratamientos (RS7 y RA15), los cambios se observaron sólo cuando los animales permanecieron en JN, mientras que en el caso de los otros dos grupos (RA7 y RS15) aparecieron cuando las ratas se alojaron en AE. Estos resultados resaltan la importancia del medio que rodea al animal y las interacciones con el mismo, dado que la existencia de diferencias en la estimulación ambiental podrían favorecer o no el desarrollo de ciertos fenotipos conductuales, como ocurre en este caso de la memoria asociativa.

#### 6.2.4. Una semana más de vida, una semana más de AE: evaluación en ratas de 35 días

En los objetivos se planteó el estudio de diferentes parámetros conductuales en animales de 1 o 2 semanas de vida. Teniendo en cuenta que en trabajos previos realizados en el laboratorio (Uran et al., 2012, 2014), las alteraciones conductuales resultaron ser transitorias ya que a los 90 DPN se revirtieron, se evaluó el comportamiento de los animales a dos edades distintas: DPN 28 y DPN 35. De esta manera, se podría obtener información acerca de, por un lado, si una semana más de vida podría llevar al restablecimiento de los comportamientos alterados y, por el otro, si un tiempo más prolongado de AE (dos semanas) puede producir efectos diferentes.

Al evaluar a estos animales, se observó que la gran mayoría de las alteraciones en el comportamiento se habían revertido. Mientras que a los 28 DPN se observaron cambios en la memoria y en comportamientos relacionados con la ansiedad, la actividad exploratoria y la evaluación de riesgos, a los 35 DPN solo se observaron algunas diferencias en la latencia al BA y el % de HD en ratas expuestas a RA. A partir de estos resultados, se podría postular que las alteraciones conductuales causadas por una exposición temprana al ruido serían transitorias y que a medida que los animales continúan madurando, su comportamiento tiende a normalizarse. Estos resultados serían de relevancia clínica ya que los daños provocados por una exposición temprana al ruido podrían revertirse con el paso del tiempo, siempre y cuando la exposición al ruido haya cesado. Algunos estudios longitudinales, como el estudio del Aeropuerto de Munich (Hygge et al., 2002), han mostrado que la exposición al ruido podría generar alteraciones cognitivas en niños que podrían revertirse en el caso de que la exposición se interrumpiera. Lamentablemente, en las ciudades urbanizadas la contaminación acústica se encuentra en aumento, por lo que los individuos suelen exponerse a altas intensidades de ruido de forma periódica (NIOSH, 1998; Morata et al., 2001; WHO, 2009, 2011; Kim et al., 2012; Gannouni et al., 2013).

Cuando los animales expuestos a RS se evaluaron a los 28 DPN, se hallaron cambios en pocos parámetros, siendo la exposición a RA más nociva. Una semana más tarde, los pocos parámetros afectados en estos grupos se habían revertido completamente. Por otra parte, en los animales expuestos a RA y evaluados al DPN 28 se encontró una variedad de alteraciones, las cuales fueron distintas según la edad de exposición; estos animales mostraron una cantidad significativamente menor de cambios conductuales una semana más tarde. Por un lado, no se hallaron alteraciones en ninguno de los dos tipos de memoria evaluados y, por el otro, las alteraciones en los comportamientos relacionados a la ansiedad fueron muy pocas, limitándose a la latencia al BA. Si bien a los 28 DPN había diferencias en varios parámetros relacionados a la ansiedad y, además, no fueron sensibles a la mayor estimulación ambiental, por lo que parecían alteraciones más arraigadas, hacia los 35 DPN también tenderían a normalizarse. Las ratas expuestas a RA15 habían presentado un aumento del comportamiento relacionado a la ansiedad y alteraciones en ambas pruebas de memoria. Además, se planteó que podría haber una estrecha relación entre ambas. Una semana más tarde, el aumento de la respuesta de ansiedad disminuyó e incluso las ratas expuestas mostraron una menor latencia al BA que sus controles. En concordancia con esta disminución, no se halló un desempeño distinto de estos animales respecto a sus controles en las pruebas de memoria. Estos resultados podrían reforzar la afirmación de dicha relación, o bien, también es posible que ambas funciones se hayan normalizado de forma independiente. Por otro lado, las ratas del grupo RA7, habían presentado un perfil opuesto, con una disminución del comportamiento relacionado a la ansiedad y un aumento de la actividad exploratoria. Una semana más tarde, casi la totalidad de los parámetros alterados se habían normalizado, lo cual demostraría que, si bien de acuerdo a la edad de exposición se podrían producir fenotipos conductuales distintos durante la peri-adolescencia, ambos tenderían a normalizarse con el paso del tiempo. Dado que se observaron pocos parámetros alterados a los 35 DPN (solo 3), no se pudo apreciar de la misma manera los efectos neuroprotectores del AE. En este sentido, no se podría afirmar si una o dos semanas de AE ejercen efectos

diferentes, dado que el crecimiento normal de las ratas produce una tendencia a la normalización de los cambios encontrados. Sin embargo, teniendo en cuenta que a los 28 DPN el AE fue capaz de prevenir varias de las alteraciones que estaban presentes en las ratas de JN y hacia los 35 DPN estos parámetros se habían normalizado, se podría plantear que una semana de AE aceleraría el proceso que ocurre de manera natural, estabilizando los parámetros conductuales alterados. En esta línea, se ha demostrado que la estimulación ambiental juega un papel crítico en la formación y el funcionamiento de los circuitos neurales (van Praag et al., 2000; Nithianantharajah & Hannan, 2006; Sale et al., 2009). Más aún, algunos estudios han reportado que la exposición a un AE durante una etapa temprana es capaz de acelerar el desarrollo neural del SNC (Van Waas & Soffié, 1996; Sale et al., 2009; He et al., 2010; Liu et al., 2012). En particular, en relación al HC, se ha encontrado que la estimulación ambiental temprana podría potenciar la acción del GABA y promover el desarrollo de sinapsis GABAérgicas y glutamatérgicas en la región CA1 (He et al., 2010), así como también promover la maduración morfológica y electrofisiológica de las células granulares del GD (Liu et al., 2012). Por último, una semana de AE generó un aumento en el desempeño en la prueba EI en algunos grupos expuestos, por lo que se podría postular que el AE podría hacer visibles algunos fenotipos que no se observaron en condiciones de alojamiento en JN. Luego de dos semanas de AE, se observó un resultado similar en las ratas expuestas a RA7, ya que se mantuvo el aumento de la relación T2/T1, pero además, estos animales presentaron variaciones en otros parámetros. Si bien estos cambios se produjeron respecto a un único esquema de exposición, resulta llamativo que mientras la tendencia general de los animales expuestos alojados en JN es normalizar su desempeño, las ratas del grupo RA7-AE tienden a diferenciarse de sus respectivos controles. Este hecho pondría en duda hasta qué punto los efectos de la exposición temprana al ruido serían transitorios, normalizándose hacia los 35 DPN, al menos para las ratas expuestas a RA7. Además, estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la estimulación ambiental en etapas posteriores del desarrollo (como la peri-adolescencia), dado que puede llevar a que se produzcan o no ciertos fenotipos conductuales. En

resumen, experiencias aversivas tempranas, como puede ser la exposición al ruido, podrían generar marcas en los animales que perduren en el tiempo e influyeran su futuro desarrollo. A su vez, estos procesos se verían influenciados por las interacciones con el ambiente que continúan existiendo en etapas posteriores de la vida, dado que, como es sabido, el cerebro de los mamíferos se desarrolla y madura dentro de una intrincada red de influencias genéticas, epigenéticas y ambientales, a lo largo de distintas etapas y periodos de sensibilidad, en donde las experiencias tempranas son muy importantes para dar forma a diferentes fenotipos a lo largo de la vida (Mychasiuk et al., 2012; Dixon et al., 2016).

### 6.3. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo, presente en diferentes condiciones patológicas, es capaz de causar disfunción y muerte celular (Sathyaikumar et al., 2007; Caceres et al., 2009; Bendix et al., 2012; Sies et al., 2015). En particular, se ha reportado que la exposición al ruido puede causar estrés oxidativo en estructuras de la vía auditiva, como la cóclea, provocando pérdida de la audición (Yamane et al., 1995; Ohlemiller et al., 1999; Yamashita et al., 2004; Seidman & Standring, 2010; Fetoni et al., 2015). Más aún, algunos trabajos han reportado estrés oxidativo en estructuras del SNC y se ha planteado que el daño celular inducido por este mecanismo podría subyacer a las diferentes alteraciones conductuales (Mandikandan et al., 2006, 2013; Samson et al., 2007; Uran et al., 2010, 2014; Cheng et al., 2016; Liu et al., 2016; Wang et al., 2016). Considerando estos antecedentes, en el presente trabajo se planteó que el estrés oxidativo podría ser uno de los mecanismos causantes de las alteraciones producidas por una exposición temprana al ruido. Por este motivo, se estudiaron diferentes marcadores de estrés oxidativo a tiempos cortos post-exposición y a largo plazo, a la misma edad en que se llevaron a cabo las diferentes pruebas conductuales.

Luego de la exposición al ruido, se observaron algunas diferencias en los niveles de ROS que variaron según el esquema de exposición. Se observó una disminución en este parámetro dentro de la primera hora post-exposición en los animales expuestos a RS, tanto a los 7 como a los 15 días, que se normalizó al día siguiente. Por el contrario, prácticamente no se observaron cambios en los niveles de ROS en las ratas expuestas a RA. En consecuencia, se podría postular que una única exposición al ruido no sería suficiente para generar estrés oxidativo a tiempos cortos, ya que en caso de que se haya producido un aumento de los niveles de ROS, este aumento habría sido rápidamente contrarrestado por las defensas antioxidantes, manteniendo el balance del estado redox (como en el caso del grupo RA7) o disminuyendo los niveles de ROS (como en el grupo RA15). En cambio, exposiciones repetidas podrían generar un desbalance en el estado oxidativo. Es posible que en un principio el sistema de defensas antioxidantes haya sido capaz de contrarrestar un probable aumento de ROS manteniendo el balance redox, como se observó en el caso de las ratas expuestas a RA, pero cuando se repitieron las exposiciones, se inducirían más ROS, que generarían un aumento de la actividad de los antioxidantes, gatillando un desbalance a favor de los mismos y, en consecuencia, una falla en el mantenimiento de la homeostasis. Finalmente, si bien exposiciones repetidas podrían favorecer un desbalance oxidativo, en ambos grupos expuestos los niveles de ROS volvieron a los valores basales al día siguiente. Dado que el grupo RA7 no mostró cambios en los niveles de ROS, probablemente debido a la compensación del sistema de antioxidantes endógenos y que el grupo RS7 mostró una disminución 1 hora después de la última exposición (es decir, el DPN 11), podría sugerirse que un aumento inicial en los niveles de ROS, producido con posterioridad al DPN 7 y anterior al DPN 11, estaría gatillando una respuesta del sistema endógeno de antioxidantes, responsable de disminuir la producción de ROS. Posiblemente el cese de la exposición al ruido y por ende de la producción de ROS, haya permitido que se recupere el balance en el estado redox mediante la acción del sistema antioxidante.



La CAT forma parte de las defensas antioxidantes que protegen a las células del daño causado por el estrés oxidativo. Esta enzima actúa transformando el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua (Glorieux et al., 2015). En este trabajo se evaluó la actividad enzimática de CAT a tiempos cortos y no se encontraron diferencias significativas entre los animales expuestos y sus controles, en ninguno de los esquemas de exposición. Estos resultados contradicen los hallazgos de otros estudios en los que se observaron cambios en la actividad de esta enzima como parte del estrés oxidativo gatillado en el HC por la previa exposición al ruido (Manikandan et al., 2006, 2013). En estos trabajos se evaluó la actividad de CAT luego de diferentes esquemas de exposición a ruido moderado y encontraron que incluso una única exposición era suficiente para producir un aumento de la actividad de esta enzima. Resultados similares fueron reportados por Uran et al. (2014), que encontraron un aumento de la actividad de CAT luego de una única exposición al ruido a los 15 DPN. En el presente trabajo, es posible que los cambios en los niveles de ROS hayan sido contrarrestados por otras defensas antioxidantes y no por CAT, lo que podría explicar por qué no se observaron cambios en su actividad. En este sentido, algunos autores evaluaron y reportaron cambios en la actividad de otras enzimas antioxidantes en el HC luego de la exposición al ruido, entre las que se encuentran SOD y glutatión peroxidasa (Manikandan et al., 2006, 2013; Uran et al., 2014; Cheng et al., 2016; Liu et al., 2016).

Por otro lado, algunas investigaciones reportaron cambios en el estado oxidativo de estructuras del SNC varios días después de la exposición al ruido (Uran et al., 2010, 2014; Wang et al., 2016). En el presente trabajo, se evaluaron los niveles de ROS a largo plazo y se observaron cambios en todos los grupos de animales expuestos en comparación con sus controles, por lo que el modelo de exposición al ruido utilizado también sería capaz de generar cambios que perduran en el tiempo. Mientras que los animales expuestos a RA7, RS7 y RS15 presentaron una disminución de los niveles de ROS, se encontró un aumento en los animales expuestos a RA15. Considerando esta diferencia, se podría decir que el esquema exposición y la edad en la que se produjo no sólo serían factores

determinantes en los cambios que se pueden producir en el estado redox a tiempos cortos, sino también en su desarrollo a lo largo del tiempo.

Esta disminución en los niveles de ROS podría estar mediada por un aumento de las defensas antioxidantes e implicaría una mayor protección de las células ante los efectos dañinos del estrés oxidativo (Halliwell et al., 2006; Wahlqvist et al., 2013; Siti et al., 2015). Sin embargo, si bien una mayor protección ante el estrés oxidativo sería beneficiosa, algunos autores han señalado que bajos niveles de ROS también podrían traer consecuencias negativas dado que las ROS están implicadas en diferentes procesos fisiológicos (Owusu-Ansah & Banerjee, 2009; Massad & Klainn, 2011; Wahlqvist, 2013; Kamogashira et al., 2014). La influencia de ROS en los mismos se basa en su capacidad para modificar la actividad de determinadas moléculas que contienen dominios sensibles a las condiciones redox. De esta manera, están implicadas en varios procesos fisiológicos claves como la respiración celular, el sistema de defensa de fagocitos, la apoptosis y la necrosis, entre otros. Más aún, estudios recientes han mostrado que las ROS serían moléculas de señalización claves para que se produzcan de manera adecuada la plasticidad sináptica y la formación de memorias (Revisado en Massad & Klainn, 2011). En consecuencia, si bien altos niveles de ROS podrían generar disfunción y muerte celular, bajos niveles de estas especies también podrían traer consecuencias negativas en caso de verse afectadas las cadenas de señalización en donde las ROS cumplen una función. Por tal motivo, los cambios en los niveles de ROS en el HC observados en este trabajo, podrían subyacer los cambios conductuales

Las tiorredoxinas (Trx) son pequeñas moléculas que forman parte de las defensas antioxidantes y cumplen un rol en la señalización redox. Cuando se produce un aumento de los niveles de ROS, la expresión de las Trxs aumenta y actúan reduciendo puentes disulfuro en el medio intracelular. En los mamíferos, existen dos sistemas de Trxs: Las tiorredoxinas-1 (Trx1) presentes en el citosol y las tiorredoxinas-2 (Trx2) que se encuentran en mitocondrias (Lu & Holmgren, 2014; Mukwevho et al., 2014). En el presente trabajo, se estudió por primera vez si la exposición al ruido era capaz de generar cambios en los niveles de Trxs en el

HC. Los datos mostraron un aumento significativo de los niveles de Trx1 en los animales expuestos en comparación con sus respectivos controles, para los cuatro esquemas de exposición al ruido en el DPN 28. Por otra parte, solamente se encontró un aumento de los niveles de Trx2 en los animales expuestos a RS7. En base a estos resultados, podría plantearse que la exposición temprana al ruido sería capaz de alterar los niveles de Trxs a largo plazo y, además, que Trx1 sería más sensible a los efectos del ruido ya que se encontró alterada en todos los grupos expuestos, mientras que Trx2 se vio modificada únicamente cuando los animales fueron expuestos durante cinco días consecutivos desde los 7 DPN. Más aún, el incremento en los niveles de Trxs podría explicar la disminución de los niveles de ROS en estos animales, en tanto las Trxs actúan reduciendo el medio intracelular. El aumento de Trx1 y Trx2 en animales del grupo RS7, junto con la disminución de ROS, sugiere que a los 7 DPN habría más posibilidades de contrarrestar un posible daño oxidativo en el HC.

Por otro lado, al igual que ocurrió a tiempos cortos, no se observaron cambios en la actividad de CAT en el DPN 28, en ninguno de los grupos expuestos. Estos resultados difieren de los hallazgos de otros autores (Uran et al., 2014; Wang et al., 2016) que encontraron cambios a largo plazo en la actividad de esta enzima, en conjunto con variaciones de los niveles de ROS en los animales expuestos al ruido. Como se comentó anteriormente, es posible que otras enzimas o compuestos no enzimáticos que no fueron analizados en el presente trabajo sean los responsables de las variaciones en los niveles de ROS. Si bien los cambios en los niveles de Trxs permitirían explicar en parte por qué se produjo una disminución en los niveles de ROS, sería relevante el estudio futuro de otros antioxidantes para poder comprender qué otros mecanismos se encuentran involucrados en los cambios hallados a largo plazo.

Algunos estudios reportaron efectos beneficiosos del AE en el balance oxidativo, favoreciendo la actividad enzimática y disminuyendo las ROS, tanto en modelos de animales sanos como de lesiones en el SNC (Herring et al., 2010; Cechetti et al., 2013; Cheng et al., 2014; Mármol et al., 2015, 2017; Muhammad et al., 2016). En el presente trabajo, se evaluó si una semana de AE era capaz de

prevenir las alteraciones encontradas en los marcadores de estrés oxidativo estudiados. Los datos mostraron que si bien una semana de AE fue suficiente para prevenir el aumento de los niveles de Trxs, no generó variaciones en los niveles de ROS. A partir de estos resultados, se podría postular que una semana de AE no sería suficiente para generar la normalización del balance redox. Si bien habría algunos antioxidantes más sensibles a este tipo de estimulación, como las Trxs, podría haber otros que permanezcan sin cambios y, por este motivo, que se sigan observando las alteraciones en los niveles de ROS. Para poner a prueba dicha hipótesis sería necesario estudiar otros componentes que forman parte del sistema endógeno de antioxidantes. Finalmente, se observó una disminución en la actividad de CAT en las ratas expuestas a los 7 DPN cuando se alojaron en AE. Esta disminución contradice los efectos positivos del AE encontrados en otros trabajos dado que una menor actividad de CAT podría favorecer un aumento de los niveles de ROS. Si bien se encontró que estas ratas poseen bajos niveles de ROS, podrían estar más desprotegidas ante nuevas situaciones que favorezcan un aumento de estas especies. No obstante, podría postularse que un aumento inicial de ROS podría mediar la oxidación a la misma enzima antioxidante, generando una pérdida de su actividad.

Por último, algunos de estos parámetros (Trx1 y Trx2) fueron evaluados una semana más tarde, como se realizó con las pruebas conductuales. Mientras que a los 28 DPN se observó un aumento de los niveles de Trx1 en todos los animales expuestos y alojados en JN, en comparación con sus controles, a los 35 DPN este aumento se revirtió en todos los grupos. Las ratas expuestas a RA15, RS7 y RA7, presentaron valores similares a los de sus respectivos controles, mientras que las ratas expuestas a RA7 mostraron una disminución. Por otro lado, el aumento en los niveles de Trx2 que presentaban los animales expuestos a RS7 a los 28 DPN, también se revirtió una semana más tarde. Por último, no se observaron diferencias significativas en la capacidad preventiva del AE luego de una semana más de alojamiento, dado que una semana fue suficiente para prevenir las alteraciones encontradas en los niveles de Trxs. En resumen, al igual que se observó respecto a los parámetros conductuales, en la medida que continúa el

desarrollo de los animales, los niveles alterados de Trxs observados a los 28 DPN tienden a normalizarse, sin encontrarse diferencias significativas respecto a los animales controles hacia los 35 DPN.

En resumen, la exposición temprana al ruido podría generar alteraciones en el balance oxidativo del HC, tanto a tiempos cortos como a largo plazo. Además, estos cambios estarían influenciados tanto por el esquema de exposición como por la edad en la cual el animal fue expuesto. A tiempos cortos, la exposición a RA no sería suficiente para generar estrés oxidativo, sin embargo, una exposición más prolongada podría favorecer la disminución de ROS luego de un pico inicial, el cual volvería a valores normales al día siguiente, cuando cesa la exposición. Por otra parte, a largo plazo, se observó tanto una disminución como un aumento de los niveles de ROS, que varió según el esquema de exposición. Se encontró que los animales expuestos presentaban un aumento de las Trxs, el cual podría explicar, en parte, la disminución de los niveles de ROS de algunos grupos, mientras que no sería suficiente para contrarrestar el aumento de ROS en los animales expuestos a RA15. Por otra parte, el AE como herramienta de neuroprotección sería capaz de revertir los cambios en los niveles de Trxs, pero no ejercería modificaciones en los niveles de ROS alterados. Finalmente, no se encontraron variaciones en los niveles de CAT a tiempos cortos y solo se observaron cambios en animales alojados en AE que fueron expuestos a R7. Considerando estos resultados, sería relevante el estudio de otros marcadores de estado oxidativo que permitan entender mejor cuáles son los mecanismos involucrados en estos cambios y que determinan cómo se va a desarrollar dicho balance oxidativo a lo largo del tiempo. Además, si bien una semana de AE no fue suficiente para normalizar los niveles de ROS, sería interesante evaluar si fue capaz de modificar la actividad de otras defensas antioxidantes, así como también, si el alojamiento durante un tiempo más prolongado podría traer efectos más beneficiosos.

#### 6.4. Neurotransmisión aminoacidérgica

Los sistemas de neurotransmisión GABAérgico y glutamatérgico juegan un rol fundamental en varios procesos implicados en el desarrollo del SNC y en la neurogénesis en etapas posteriores (Behar et al., 2000; Haydar et al., 2000; Maric et al., 2001; Hardingham & Bading, 2003; Matsuzaki et al., 2004; Graybeal et al., 2012; Mattison et al., 2014). Teniendo en cuenta, por un lado, que un desbalance en estos sistemas puede traer consecuencias patológicas y, por el otro, que el correcto desarrollo de estos procesos depende tanto de la programación genética como de la influencia ambiental (Ben-Ari, 2002), la exposición al ruido durante el desarrollo podría generar alteraciones en estos sistemas que perduren en el tiempo.

Para determinar posibles cambios en la neurotransmisión GABAérgica en el HC, se evaluaron los niveles de las enzimas GAD65 y GAD67, que se encuentran presentes en estas neuronas y tienen un rol clave en la síntesis de GABA (Erlander et al., 1991; Steiner et al., 2016; Wu et al., 2017). En el presente modelo de ruido, no se observaron diferencias significativas entre los niveles de GAD65/67 de los animales expuestos y sus respectivos controles, en ninguno de los grupos expuestos, en ninguna de las dos edades que se evaluaron (28 y 35 DPN). Por otro lado, se observó un aumento en este parámetro en los animales expuestos a RS15 cuando se alojaron una semana en AE, el cual se revirtió una semana más tarde, sin encontrarse diferencias significativas en ninguno de los otros grupos expuestos alojados en AE por una o dos semanas. En base a estos resultados, se podría plantear que el presente modelo de exposición al ruido no generaría alteraciones duraderas en el sistema de neurotransmisión GABAérgica en el HC.

Por otro lado, se estudiaron los niveles del transportador de glutamato EAAT-1, una proteína localizada en células gliales y las terminaciones nerviosas de las neuronas pre-sinápticas. Una vez que el glutamato es liberado en la sinapsis y ejerce su acción en los receptores post-sinápticos, es rápidamente capturado a través de los transportadores ubicados en la membrana, entre los que se encuentra el EAAT-1. Estos transportadores cumplen un rol muy importante en

la modulación de los niveles de glutamato en el medio extracelular y, por ende, en la prevención de la excitotoxicidad (Neves et al., 2018; Parkin et al., 2018; Poletti et al., 2018). Cuando se compararon los niveles de EAAT-1 en el HC de ratas expuestas con sus respectivos controles (28 DPN), se encontró un aumento en los animales expuestos a RS7, sin encontrarse diferencias en los otros grupos expuestos según otros esquemas. El hecho de que los animales del grupo RS7 tengan un mayor nivel de EAAT-1, implicaría una mayor protección ante la excitotoxicidad, debido a que habría más transportadores capaces de remover el glutamato del medio extracelular. Además, es posible que este aumento se deba a un mecanismo compensatorio tendiente a contrarrestar un aumento previo en los niveles de glutamato. Varios estudios han reportado un aumento en la expresión de los transportadores de glutamato como parte de la respuesta defensiva de las células gliales ante una injuria, para reducir el daño neuronal causado por la excitotoxicidad (Vallejo-Illarramendi et al., 2006; Beschoner et al., 2007a, 2007b; Bigdeli et al., 2008; Arranz et al., 2010; Yatomi et al., 2013). Por ejemplo, Beschoner et al. (2015), encontraron que la expresión de EAAT-1 glial aumenta en cerebros humanos unas horas después de que se produjo una isquemia y este aumento puede persistir durante meses. Según esta investigación, este efecto neuroprotector sería mediado por la microglía y los astrocitos. Más aún, Gao et al. (2015b) mostraron en un modelo de cultivo celular, que neuronas aisladas son sensibles al daño de la hipoxia, mientras que se vuelven más resistentes si están en conjunto con astrocitos. Además, en este trabajo la sobrevivencia de las neuronas con diferentes contenidos de oxígeno varió de acuerdo a la expresión de EAAT-1: la mayor expresión de EAAT-1 favorece la sobrevivencia neuronal. Por último, si bien el EAAT-1 está presente en las neuronas, se encuentra principalmente en las células gliales, por lo que resultaría factible que el aumento reportado en el grupo expuesto a RS7, esté relacionado a la respuesta defensiva de estas células ante la exposición a la injuria (Parkin et al., 2018). La mayor vulnerabilidad de este grupo podría relacionarse con la mayor inmadurez de la neurotransmisión glutamatérgica a esta edad y con la necesidad de la repetición de la injuria para que los cambios se hagan visibles.

Cuando los animales expuestos a RS7 se alojaron una semana en AE, presentaron valores de EAAT-1 similares a los de sus controles, por lo que el AE previno dicho aumento. Previamente se ha reportado en algunas investigaciones que el alojamiento en un AE puede normalizar alteraciones de la neurotransmisión glutamatérgica, generando cambios en las concentraciones de glutamato extracelular y en la expresión de receptores AMPA o NMDA en animales adultos (Lee et al., 2003; Bredy et al., 2004; Segovia et al., 2006; Mora et al., 2007). Además, Kentner et al. (2016) encontraron que el AE puede recuperar la expresión de EAAT-2 en CPF, en animales que presentaban un déficit a causa de una infección prenatal. En el presente trabajo, una semana de AE normalizó los niveles de EAAT-1 que se encontraban elevados, posiblemente a causa de una gliosis reactiva. El estudio futuro de otros marcadores de la neurotransmisión glutamatérgica podrían dar luz acerca de los mecanismos involucrados en estos cambios, considerando que la normalización de los niveles de EAAT-1 podría implicar una disminución de la respuesta neuroprotectora por un lado, o bien una mejoría del medio extracelular (menos excitotóxico) que prevenga el aumento de la expresión de EAAT-1 como parte de una respuesta defensiva.

Por otro lado, se analizaron los niveles de EAAT-1 en animales de 35 DPN y no se observaron diferencias significativas entre los animales expuestos y sus respectivos controles, en ninguno de los grupos. El aumento que se observó una semana antes, fue prevenido al continuar el desarrollo de los animales, igual a lo observado con otros parámetros evaluados. Además, considerando que una semana de AE produjo una normalización de los niveles de EAAT-1 en el grupo expuesto a RS7, resultando en un valor similar al que presentan los animales de 35 DPN, se podría plantear, una vez más, que una mayor estimulación ambiental aceleraría los procesos que ocurrirían de forma natural en los animales cuando continúa su desarrollo, incluyendo esta vez cambios en la neurotransmisión glutamatérgica.

Finalmente, se halló una disminución de los niveles de EAAT-1 en el HC de ratas expuestas a RA15 en comparación con sus controles, cuando se alojaron en AE. Resulta llamativo que los animales expuestos a los 15 DPN (figura 19b), si



bien estadísticamente solo hay diferencias entre los animales expuestos a RA15-AE y sus controles, presentan una tendencia general a menores niveles de EAAT-1, en comparación a sus controles. Esta tendencia no se observó una semana antes en las ratas de 28 DPN, que mostraron resultados más semejantes. Considerando que el grupo RA15 presentó un aumento de los niveles de ROS y que el estrés oxidativo ha sido propuesto como un mecanismo que puede favorecer la excitotoxicidad (Nguyen et al., 2011; Stojanovic et al., 2014), estas ratas podrían ser más vulnerables a sufrir daños por estrés oxidativo, en caso de que se presenten futuros estresores ambientales.

Se encontró un solo trabajo en la literatura en el que se evaluaron posibles cambios en la neurotransmisión GABAérgica y glutamatérgica a causa de la exposición al ruido. En dicho trabajo, Cui et al. (2009) encontraron que la exposición crónica al ruido moderado (30 días consecutivos), en animales adultos, podría generar un desbalance en estos sistemas a favor del glutamato, lo que generaría excitotoxicidad y disfunción neuronal. Es posible que en el presente trabajo no se hayan encontrado efectos tan nocivos en los sistemas de neurotransmisión estudiados dado que no se realizó una exposición al ruido tan prolongada. Como se mencionó anteriormente, la exposición al ruido favorecería el aumento de los niveles de ROS, que continuaría incrementándose a medida que se produzcan nuevas exposiciones. Sin embargo, el hecho de que en este modelo la exposición al ruido no haya sido mayor a cinco días consecutivos, podría favorecer la posterior acción de mecanismos defensivos que permitan contrarrestar los daños producidos, favoreciendo la normalización de los parámetros alterados. En cambio, en un modelo de exposición más prolongado, los mecanismos compensatorios podrían ser insuficientes para contrarrestar el daño producido, favoreciendo un aumento de la excitotoxicidad y el daño celular.

#### 6.5. Inmunohistoquímica

La gliosis reactiva consiste en un mecanismo defensivo que se produce en respuesta a lesiones cerebrales de diversas etiologías y resulta esencial para

limitar el área de daño y favorecer la posterior remodelación y recuperación de la función neural (Sofroniew, 2009; Sofroniew et al., 2010; Verkhratsky & Parpura, 2010). Si bien se ha demostrado que la gliosis reactiva implica una amplia gama de respuestas, se ha reportado que durante este proceso algunas células, como los astrocitos, experimentan un cambio peculiar en su apariencia, caracterizado por la hipertrofia extensa del cuerpo celular y los procesos citoplasmáticos (entre los que se incluye un aumento de la expresión de GFAP), así como un aumento de su proliferación (Eng & Ghirnikar, 1994; Middeldorp & Hol, 2011; Brenner, 2015; Yang & Wang, 2015).

En el presente trabajo se planteó la hipótesis de que la exposición temprana al ruido moderado podría inducir alteraciones en la neurotransmisión aminoacídica, ya sea generando un desbalance a favor de la excitotoxicidad, lo cual podría acarrear consecuencias negativas para las células como se encontró en otros modelos (Cui et al., 2009) o, por el contrario, favoreciendo una gliosis reactiva como mecanismo neuroprotector para contrarrestar el daño inducido. A partir de los resultados obtenidos se planteó que en el grupo RS7, el hallazgo de un aumento en los niveles del transportador EAAT-1 implicaría una mayor protección ante la excitotoxicidad y sería el resultado de una respuesta defensiva de las células gliales –una gliosis reactiva- para contrarrestar un aumento previo de los niveles de glutamato y reducir el daño neuronal. En correlación con este aumento, al analizar el área reactiva de GFAP en preparados de HC, se observó un aumento de este parámetro en las ratas expuestas a RS7, lo que indicaría que efectivamente se produjo una gliosis reactiva. En otras palabras, la exposición a RS7 induciría en el HC de estos animales una gliosis reactiva, caracterizada por una hipertrofia del cuerpo celular y un aumento de la expresión de GFAP, que implicaría además un aumento en los transportadores de glutamato y la consecuente neuroprotección ante los efectos excitotóxicos de este neurotransmisor en el medio extracelular. Además, el aumento del área reactiva de GFAP en este grupo de animales, se produjo en las tres subregiones analizadas (CA1, CA3 y GD), demostrando que este mecanismo no estaría restringido a una porción específica del HC, sino que parecería afectarlo de forma

global. En contraste, no se observaron cambios significativos entre los otros grupos de animales expuestos al ruido y sus respectivos controles en ninguna de las subregiones del HC analizadas.

Por otra parte, cuando los animales expuestos a RS7 se alojaron una semana en AE, no se observó el aumento de GFAP en ninguna de las tres subregiones analizadas del HC. La normalización de este parámetro correlaciona, una vez más, con los cambios en los niveles de EAAT-1 observados en este grupo de animales, que se normalizaron luego del alojamiento en AE por una semana. Considerando los resultados obtenidos en este trabajo y de otros estudios en los que se encontró que el AE puede generar cambios en la neurotransmisión glutamatérgica (Lee et al., 2003; Bredy et al., 2004; Segovia et al., 2006; Mora et al., 2007; Szabadfi et al., 2009), se podría plantear que el AE favorecería un medio extracelular menos excitotóxico, lo cual podría ser capaz de prevenir la puesta en marcha de una gliosis reactiva y, por ende, el aumento en los niveles de EAAT-1.

#### 6.6. Relaciones entre los distintos hallazgos

En el presente trabajo, se estudiaron los efectos de la exposición temprana al ruido en diferentes parámetros conductuales, moleculares e histológicos. Se observaron diferentes alteraciones en los parámetros evaluados que dependerían tanto de la edad en la que los animales fueron expuestos, como del esquema de exposición (RA o RS). Además, algunos de estos parámetros fueron estudiados a distintos tiempos, lo que permitió observar una tendencia general hacia la normalización de estos cambios, pareciéndose cada vez más a los valores de los animales no expuestos.

Si bien aún no se conocen del todo los mecanismos mediante los cuales el ruido generaría alteraciones en estructuras del SNC, se ha propuesto que lo haría mediante la activación de la vía auditiva. Es sabido que el ruido puede generar daños en la vía auditiva, afectando su función y generando un ingreso anormal de señales auditivas al cerebro. Además, se sabe que el HC responde a estímulos auditivos y que, por este motivo, podría verse afectado por el ruido (Xi et al., 1994;

Sakurai, 2002; Kraus et al., 2010). Por otra parte, también se ha planteado que el ruido podría generar alteraciones en el HC por otras vías no convencionales, como por ejemplo, por la percepción emocional del sonido y una respuesta de estrés mediada por el eje HPA (Kraus et al., 2010; Jauregui-Huerta et al., 2010; Huet-Bello et al., 2017). En el presente trabajo, se expusieron grupos de animales que tenían una vía auditiva desarrollada así como otros que poseían una vía auditiva inmadura y en ambos grupos se encontraron diferentes alteraciones en parámetros relacionados al HC. Considerando estos resultados, se podría plantear que la vía auditiva no sería la única vía mediante la cual el ruido puede afectar al SNC, dado que animales de 7 DPN, con una vía auditiva aún no funcional, presentaron alteraciones a largo término. Alternativamente, estudios recientes han planteado que el ruido podría afectar al SNC de forma directa, a través de la vibración mecánica de los tejidos (Säljö et al., 2011; Uran et al., 2014). Según Säljö et al. (2011) el cuero cabelludo, el cráneo y el líquido céfaloraquídeo, que separan al cerebro del aire circundante en el medio externo, no serían suficiente protección contra altas intensidades de ruido. Considerando que las ratas expuestas durante la primera semana de vida poseen un cráneo que se encuentra aún en vías de desarrollo y que, por lo tanto, se encontrarían más desprotegidas que los individuos mayores, es posible que la exposición al ruido haya afectado al tejido nervioso de forma directa, como describen estos autores.

En el presente trabajo se observaron alteraciones tanto en animales expuestos a los 7 DPN, como a los 15 DPN. La exposición durante ambas edades sería capaz de generar alteraciones, no habiendo una edad más susceptible que la otra, si bien fue un factor determinante en el desarrollo de las alteraciones, dado que variaron según la edad de exposición. Por ejemplo, la exposición a RA a los 7 DPN favoreció una disminución del comportamiento relacionado a la ansiedad a los 28 DPN, mientras que la exposición a los 15 DPN generó un aumento de dichos comportamientos. Estas diferencias podrían deberse a que al momento de la exposición, los animales estaban transitando diferentes etapas del desarrollo del SNC, en particular del HC. Por ejemplo, la primera semana de vida corresponde al primer pico de neurogénesis de las células granulares del giro dentado, mientras

que durante la segunda semana de vida, se llevan a cabo procesos claves de diferenciación y sinaptogénesis de las células piramidales de CA3 (Avishai-Eliner et al., 2002).

Por otra parte, se utilizaron dos esquemas de exposición distintos: una única exposición (RA) y cinco días consecutivos de exposición al ruido (RS), los cuales serían otra variable fundamental en el desarrollo de las alteraciones provocadas por el ruido. Por ejemplo, se observó un mayor número de alteraciones conductuales cuando las ratas fueron expuestas a RA, habiendo pocos parámetros alterados en los animales expuestos a RS. En contraste, la exposición a RS provocaría una disminución de los niveles de ROS dentro de la primera hora post-exposición, que no se observó en el caso de las ratas expuestas a RA. Estos cambios parecerían depender del esquema de exposición y no de la edad en que fueron expuestos los animales, ya que ocurrió de igual manera para ambas edades. El hecho de que un estímulo como el ruido pueda generar efectos distintos según la frecuencia con la cual se presentó, parecería estar relacionada con la respuesta del organismo a dicha injuria y la puesta en marcha de mecanismos que permitan contrarrestar los efectos nocivos. Si bien a tiempos cortos la exposición a RS resultó más nociva, ambos esquemas de exposición generaron en igual medida alteraciones a largo plazo, como se encontró en los animales de 28 DPN y, además, ambos tendieron a normalizarse hacia los 35 DPN. Si bien en este trabajo se encontraron cambios en marcadores de estrés oxidativo, lo cual podría explicar en parte los mecanismos involucrados en la defensa ante la injuria, sería relevante el estudio de estos marcadores y otros más (como por ejemplo, SOD y glutatión peroxidasa) a diferentes tiempos intermedios entre la exposición y los 28 DPN, con el objeto de dilucidar los mecanismos defensivos gatillados por los diferentes esquemas de exposición al ruido.

Además, se observaron cambios específicos para algunos esquemas de exposición cuando se realizaron en una edad determinada. Por ejemplo, se encontró un déficit en la memoria de habituación y un aumento de los niveles de ROS a los 28 DPN, solamente en los animales expuestos a RA a los 15 DPN. De la misma manera, se observó un aumento de los niveles de Trx2 y de EAAT-1 a

los 28 DPN, únicamente en los animales expuestos a RS a los 7 DPN. Es decir, que hay cambios que dependerían no solo del esquema de exposición y la edad en la que los animales fueron expuestos, sino de la combinación de ambos factores. En consecuencia, una única exposición al ruido o durante cinco días consecutivos, activaría diferentes mecanismos en el SNC de los animales, dependiendo de la etapa del desarrollo en el que se encuentren. Además, otro factor a tener en cuenta es el hecho de que el ruido podría estar afectando a estos individuos de forma distinta, dadas las diferencias en la madurez de la vía auditiva.

En el presente trabajo se propusieron dos mecanismos mediante los cuales la exposición al ruido podría haber generado las alteraciones encontradas. Se propuso por un lado, que la exposición al ruido podría generar un desbalance oxidativo, caracterizado por una sub- o sobre-estimulación del sistema de antioxidantes y, por el otro, que podría generar alteraciones en el sistema de neurotransmisión aminoacérgico, por ejemplo favoreciendo la excitotoxicidad. Se sabe que ambos mecanismos se encuentran estrechamente relacionados, ya que uno puede favorecer el desarrollo del otro (Martindale et al., 2002; Lipton et al., 2008; Nguyen et al., 2011; Stojanovic et al., 2014). Se estudiaron diferentes marcadores de estrés oxidativo y se encontraron cambios, tanto a corto como a largo término (28 DPN). Se observó una disminución en los niveles de ROS que podría ser consecuencia de la respuesta del sistema antioxidante ante un previo aumento de estas especies, y dicho desbalance parecería ser mayor en tanto aumentan los días de exposición. Sin embargo, estos niveles vuelven a normalizarse una vez que la exposición al ruido cesa. Además, la exposición temprana al ruido sería capaz de generar cambios a largo plazo, favoreciendo un aumento o una disminución de los niveles de ROS, dependiendo de la edad y el esquema de exposición. Al estudiar las defensas antioxidantes, se observó un incremento de Trx1 en todos los grupos y de Trx2 en las ratas expuestas a RS7, mientras que no se observaron cambios significativos en la actividad de CAT. En tres de los grupos expuestos al ruido (RA7, RS7 y RS15), se encontró un desbalance oxidativo a favor de los antioxidantes, mientras que en uno de los grupos (RA15) se observó un aumento tanto de las ROS como de los

antioxidantes. Considerando estos resultados, se podría sugerir que el ruido sería capaz de producir un desbalance oxidativo que perdura en el tiempo y está presente incluso hasta los 28 DPN. Dado que se evaluaron algunos de estos parámetros a los 35 DPN y se observó una normalización de los mismos, es probable que este desbalance sea transitorio y se revierta a medida que los animales continúan desarrollándose. Por último, es posible que este mecanismo haya mediado, al menos en parte, las alteraciones conductuales que presentan estos animales.

Por otra parte, no se observaron cambios duraderos en la neurotransmisión GABAérgica y se encontró un aumento del transportador EAAT-1 solamente en ratas expuestas a RS7. Este incremento en los niveles del transportador de glutamato tendría un efecto neuroprotector, dado que los animales estarían más protegidos ante un eventual aumento del glutamato en el medio extracelular. Además, en base a los resultados de la técnica de inmunohistoquímica, se planteó que este aumento podría deberse a una gliosis reactiva como respuesta defensiva ante un aumento previo de los niveles de glutamato. Por otro lado, estos animales presentaron un aumento en los niveles de Trx2, que no se observó en ninguno de los otros grupos expuestos. En consecuencia, los animales expuestos a RS7 estarían más protegidos ante el estrés oxidativo y la excitotoxicidad que los otros grupos, en caso de que tuvieran que enfrentar nuevos estresores, probablemente porque a esa edad y ante exposiciones repetidas se habrían gatillado respuestas compensatorias que tendrían como objetivo proteger contra la injuria. Esta mayor neuroprotección se correlaciona además con un mejor desempeño en las pruebas conductuales, ya que estos animales no presentaron alteraciones en ningún parámetro, excepto por un mejor rendimiento en la tarea de EI. Finalmente, se observó una normalización de este parámetro a los 35 DPN. Teniendo en cuenta por un lado, que en la mayoría de los grupos expuestos no se encontraron cambios en estos sistemas de neurotransmisión y, por el otro, que se produjo un aumento de EAAT-1 en uno de los grupos expuestos que se normalizó a los 35 DPN, se podría plantear que los animales expuestos, de acuerdo al modelo

utilizado serían capaces de contrarrestar posibles efectos dañinos de la exposición al ruido, manteniendo el balance de estos sistemas de neurotransmisión.

Finalmente, se planteó la posibilidad de que alteraciones de la función auditiva, mediadas por un aumento de la ABR, podrían estar mediando, al menos en parte, las alteraciones del comportamiento. Dado que en este trabajo no se encontraron diferencias significativas en las ABRs de animales expuestos al ruido en comparación con sus controles, se podría descartar dicha hipótesis.

En el presente trabajo, se planteó que el AE podría promover efectos neuroprotectores sobre el HC de ratas expuestas al ruido durante el desarrollo, siendo capaz de interferir con algunos de los parámetros afectados. Por este motivo, se evaluaron los efectos de una y dos semanas de alojamiento en AE, encontrando efectos neuroprotectores en la mayoría de los parámetros evaluados.

Una semana de AE fue capaz de prevenir las alteraciones halladas en parámetros conductuales como la memoria asociativa del miedo y la memoria de habituación, la actividad exploratoria y el comportamiento de evaluación de riesgos, independientemente del esquema y la edad en la que los animales se expusieron. Además, el AE fue capaz de prevenir el aumento de los niveles de Trx1, Trx2 y EAAT-1 en el HC en todos los grupos expuestos que se encontraron alterados. Finalmente, el AE previno la puesta en marcha de una gliosis reactiva en el HC, como se observó en los animales del grupo RS7. Los únicos parámetros que continuaron alterados después de una semana de AE fueron los comportamientos relacionados a la ansiedad. En relación a estos resultados, se planteó la posibilidad de que el AE podría generar cambios asimétricos en las regiones ventral y dorsal del HC, favoreciendo la prevención de las alteraciones relacionadas a la región dorsal, pero no pudiendo generar cambios en los comportamientos relacionados a la región ventral. Por otra parte, dado que se encontraron pocos parámetros alterados a los 35 DPN luego del alojamiento en JN, no se pudo determinar si dos semanas de AE podrían generar un mayor efecto neuroprotector que una semana. Finalmente, considerando que a los 35 DPN se revirtieron la mayoría de las alteraciones halladas en animales de JN, efecto similar al que se encontró en los animales de 28 DPN alojados en AE, se



propuso que el AE aceleraría el proceso que ocurre de manera natural, estabilizando los parámetros conductuales y moleculares alterados.

Además de un efecto neuroprotector, se encontró que el AE podría favorecer el desarrollo de algunos fenotipos conductuales, dado que en algunos casos se observaron diferencias significativas entre animales expuestos y sus respectivos controles solamente cuando se alojaron en AE, ya sea por una o dos semanas. Este efecto se encontró principalmente en animales expuestos a RA7 y demostró acrecentarse cuando los animales se alojaron en AE durante más tiempo. Además, si bien ocurrió en menor medida, se observaron algunas alteraciones en parámetros enzimáticos como GAD y CAT, que se normalizaron a los 35 DPN.

Por último, algunos de los parámetros estudiados a los 28 DPN se estudiaron nuevamente en animales una semana más grandes, para determinar posibles cambios a lo largo del tiempo. La mayoría de los parámetros alterados a los 28 DPN, se revirtieron una semana más tarde, presentando los animales expuestos valores similares al de sus controles. Estos cambios se observaron en la mayoría de los comportamientos evaluados, así como en los niveles de Trx1, Trx2 y EAAT-1 en el HC. Además, esta tendencia se observó en todos los grupos expuestos, independientemente del esquema de exposición y la edad en la que los animales fueron expuestos. En consecuencia, se podría concluir que las alteraciones halladas utilizando este modelo experimental serían de carácter transitorio y que dado que los animales no fueron expuestos nuevamente al ruido, pudieron recuperarse del daño inducido por la exposición temprana al ruido.



## **7. Conclusiones**

## **7. Conclusiones**

Los resultados encontrados en este trabajo permitieron elaborar las siguientes conclusiones:

1) La exposición temprana al ruido sería capaz de generar alteraciones a largo plazo en conductas relacionadas al HC, las cuales dependerían tanto de la etapa del desarrollo en la que los animales son expuestos o de la frecuencia con la que se exponen al estímulo, como de la combinación de ambos factores.

2) La exposición temprana al ruido sería capaz de producir un desbalance oxidativo en el HC, que se puede observar tanto a tiempos cortos luego de la exposición como durante la peri-adolescencia, que presentaría un perfil distinto según la etapa del desarrollo en la que los animales son expuestos, de la frecuencia con la que se exponen al estímulo, o de la combinación de ambos factores. Además, dicho desbalance oxidativo sería el resultado no solo de las características de la exposición, sino también de la respuesta del organismo a dicha injuria y la puesta en marcha de mecanismos que permitan contrarrestar los efectos nocivos. Finalmente, dicho desbalance oxidativo podría subyacer a las alteraciones conductuales encontradas.

3) Los animales expuestos al ruido serían capaces de contrarrestar los posibles efectos dañinos de la exposición al mismo, manteniendo el balance de estos sistemas de neurotransmisión aminoacidérgicos, sólo en algunos grupos, considerando:

a) Que el modelo de exposición al ruido utilizado en este trabajo no generaría alteraciones duraderas en el sistema de neurotransmisión GABAérgico.

b) Que la exposición temprana al ruido podría generar cambios en la neurotransmisión glutamatérgica solo en animales expuestos durante cinco días consecutivos en la primera semana de vida. Estos cambios serían el resultado de una gliosis reactiva, como respuesta neuroprotectora para contrarrestar un aumento previo de los niveles de glutamato.

4) La exposición temprana al ruido, por única vez o durante cinco días consecutivos, durante la primera o la segunda semana de vida, no generaría alteraciones en la ABR en animales peri-adolescentes.

5) La exposición temprana al ruido sería capaz de generar alteraciones conductuales, histológicas y bioquímicas en animales con una vía auditiva inmadura, sugiriendo que podría actuar de forma directa a través de la vibración mecánica de los tejidos.

6) Los parámetros alterados por la exposición temprana al ruido en animales de cuatro semanas de vida, tenderían a restablecerse a valores normales a medida que los animales continúan su desarrollo, sugiriéndose como modificaciones transitorias.

7) Una semana de AE durante la peri-adolescencia fue capaz de prevenir la mayoría de las alteraciones conductuales y moleculares causadas por una exposición temprana al ruido. Además, el AE aceleraría el proceso de normalización de los parámetros conductuales y moleculares alterados, que ocurre de manera natural en los animales a medida que continúan con su desarrollo. Finalmente, no solo tendría efectos neuroprotectores, sino que podría favorecer el desarrollo de algunos fenotipos conductuales.

En conclusión, el ruido constituye un contaminante ambiental presente en distintos ámbitos, por lo que muchos individuos se encuentran en riesgo de sufrir consecuencias negativas cuando se exponen al mismo. Si bien se sabe poco acerca de los efectos extra-auditivos del ruido en los individuos, menos aún se conoce sobre sus efectos en individuos en desarrollo, los cuales podrían estar en mayor riesgo de sufrir daños, debido a la mayor vulnerabilidad del SNC inmaduro a diferentes injurias. El presente trabajo podría contribuir al conocimiento de las alteraciones que puede producir la exposición temprana al ruido, así como de los mecanismos que podrían subyacer a dichas alteraciones. Además, podría favorecer el uso de una estrategia de neuroprotección como el AE, con el objeto de contrarrestar los daños inducidos. El conocimiento de los mecanismos implicados en el daño, así como de estrategias que permitan prevenir dichas

alteraciones, resulta de relevancia clínica ante un problema de la salud pública que se encuentra en aumento en las sociedades urbanizadas.



## **8. Referencias bibliográficas**

## **8. Referencias bibliográficas**

- Abel, S.M. (1990). The extra-auditory effects of noise and annoyance: an overview of research. *J Otolaryngol Suppl* 1,1-13.
- Abramovich, S.J., Gregory, S., Slemick, M. & Stewart, A. (1979). Hearing loss in very low birthweight infants treated with neonatal intensive care. *Arch. Dis. Child.* 54, 421-426.
- Alonso, M., Bekinschtein, P., Cammarota, M., Vianna, M.R.M., Izquierdo I & Medina, J.H. (2005). Endogenous BDNF is required for long-term memory formation in the rat parietal cortex. *Learn Mem* 12, 504–510.
- Altschuler, R.A. (1979). Morphometry of the effect of increased experience and training on synaptic density in area CA3 of the rat hippocampus. *J. Histochem. Cytochem.* 27, 1548–1550.
- Alvarado, J.C., Fuentes Santamaría, V., Melgar Rojas, P., Valero, M.L., Gabaldón U.I.I. M.C., Miller, J.M. & Juiz, J.M. (2015). Synergistic effects of free radical scavengers and cochlear vasodilators: a new otoprotective strategy for age-related hearing loss. *Front. Aging Neurosci.* 7, 86.
- Alvarado, J.C., Fuentes-Santamaría, V., Melgar-Rojas, P., Valero, M.L., Gabaldón-Ull, M.C., Miller, J.M. & Juiz, J.M. (2015) Synergistic effects of free radical scavengers and cochlear vasodilators: a new otoprotective strategy for age-related hearing loss, *Front. Aging Neurosci.* 7 (86)
- Alves Pereira, M. & Castelo Branco, N.A., (2007). Vibroacoustic disease: biological effects of infrasound and low-frequency noise explained by mechanotransduction cellular signalling. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 93 (1-3), 256-279.
- American Academy of Pediatrics CoEH (1997). Noise: a hazard for the fetus and the newborn. *Pediatrics* 100, 724–727
- and improves hippocampus-dependent memory. *Learn. Mem.*, 8 (1), 26-34.
- Anderson, C.M. & Swanson, R.A. (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32,1–14.

- Anderson, M. A., Ao, Y., & Sofroniew, M. V. (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neuroscience Letters*, 0, 23–29.
- Angrini, M.A. & Leslie, J.C. (2012). Vitamin C attenuates the physiological and behavioural changes induced by long-term exposure to noise. *Behavioural* 23, 119–125.
- Arendash, G.W. (2004). Environmental enrichment improves cognition in aged Alzheimer's transgenic mice despite stable  $\beta$ -amyloid deposition. *Neuroreport* 15, 1751–1754.
- Arranz, A.M., Gottlieb, M., Pérez-Cerdá, F. & Matute, C. (2010). Increased expression of glutamate transporters in subcortical white matter after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis.* 37(1):156-65.
- Artola, A., Von Frijtag, J.C., Fermont, P.C., Gispen, W.H., Schrama, L.H., Kamal, A. & Spruijt, B.M. (2006). Long-lasting modulation of the induction of LTD and LTP in rat hippocampal CA1 by behavioural stress and environmental enrichment. *Eur. J. Neurosci.* 23, 261–272.
- Ashokan, A., Hegde, A. & Mitra, R. (2016). Short-term environmental enrichment is sufficient to counter stress-induced anxiety and associated structural and molecular plasticity in basolateral amygdala. *Psychoneuroendocrinology.* 69, 189-96.
- Atucha, E., & Roozendaal, B. (2015) The inhibitory avoidance discrimination task to investigate accuracy of memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9, 60.
- Avishai Eliner, S., Brunson, K.L., Sandman, C.A., Baram, T.Z. (2002). Stressed-out, or in (utero).? *Trends Neurosci.* 25 (10), 518-24.
- Azman, K.F., Zakaria, R., AbdAziz, C., Othman, Z. & Al-Rahbi, B. (2015). Tualang honey improves memory performance and decreases depressive-like behavior in rats exposed to loud noise stress. *Noise Health* 17(75), 83–89.
- Bahi, A. (2017). Environmental enrichment reduces chronic psychosocial stress-induced anxiety and ethanol-related behaviors in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry.* Volume 77, 65-74.



- Baldini, S., Restani, L., Baroncelli, L., Coltelli, M., Franco, R., Cenni, M.C., Maffei, L. & Berardi, N. (2013). Enriched early life experiences reduce adult anxiety-like behavior in rats: a role for insulin-like growth factor 1. *J. Neurosci.* 33 (28), 11715–11723.
- Bannerman, D.M. (2004). Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 28, 273-283.
- Bannerman, D.M., Deacon, R.M.J., Offen, S., Friswell, J., Grubb, M. & Rawlins, J.N.P. (2002). A double dissociation of function within the
- Bannerman, D.M., Yee, B.K., Good, M.A., Heupel, M.J., Iversen, S.D. & Rawlins, J.N.P. (1999). Double dissociation of function within the
- Baraldi, T., Schöwe, N., Balthazar, J., Monteiro-Silva, K.C., Albuquerque, M.S., Buck, H. & Viel, T. (2013). Cognitive stimulation during lifetime and in the aged phase improved spatial memory, and altered neuroplasticity and cholinergic markers of mice. *Exp. Gerontol.* 48, 831–838.
- Barros, D.M., Izquierdo, L.A., Mello e Souza, T., Ardenghi, P.G., Pereira, P., Medina & J.H., Izquierdo, I. (2000). Molecular signalling pathways in the cerebral cortex are required for retrieval of one-trial avoidance learning in rats. *Behav Brain Res* 114, 183–192.
- Barros, D.M., Izquierdo, L.A., Mello e Souza, T., Ardenghi, P.G., Pereira, P., Medina, J.H. & Izquierdo, I. (2000). Molecular signalling pathways in the cerebral cortex are required for retrieval of one-trial avoidance learning in rats. *Behav Brain Res* 114, 183–192.
- Barros, D.M., Mello e Souza, T., De David, T., Choi, H., Aguzzoli, A., Madche, C., Ardenghi, P., Medina, J.H. & Izquierdo, I. (2001) Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D(1), beta-noradrenergic, serotonergic-1A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. *Behav Brain Res* 124, 1–7.
- Barzegar, M., Sajjadi, F.S., Talaei, S.A., Hamidi, G. & Salami, M. (2014) Prenatal Exposure to Noise Stress: Anxiety, Impaired Spatial Memory, and Deteriorated Hippocampal Plasticity in Postnatal Life. *Hippocampus* 00, 1–10.

- Bear, M.F., Connors, B.W. & Paradiso, M.A. (2002). *Neuroscience: Exploring the Brain*. 2<sup>o</sup> Ed. Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins.
- Beers Jr., R.F. & Sizer, I.W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195 (1), 133–140.
- Behar, T.N., Schaffner, A.E., Scott, C.A., Greene, C.L. & Barker, J.L. (2000). GABA receptor antagonists modulate postmitotic cell migration in slice cultures of embryonic rat cortex. *Cereb. Cortex* 10, 899–909.
- Belojevic, G., Jakovljevic, B. & Slepcevic, V., (2003). Noise and mental performance: personality attributes and noise sensitivity. *Noise Health* 6, 77–89.
- Belzung, C., & Griebel, G. (2001) Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behavioural Brain Research*, 125 (1-2), 141–149.
- Ben Ari, Y. (2002). Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nature Rev. Neurosci.* 3, 728–739.
- Ben Ari, Y. (2002). Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci.* 3 (9), 728-39.
- Benaroya Milshtein, N. (2004). Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1341–1347.
- Bendix, I., Weichelt, U., Strassera, K., Serdara, M., Endesfelder, S., Von Haefen, C., Heumann, R., Ehrkamp, A., Felderhoff-Mueser, U. & Siflinger, M. (2012). Hyperoxia changes the balance of the thioredoxin/peroxiredoxin system in the neonatal rat brain. *Brain Research* 1484, 68–75.
- Berglund, B., Lindvall, T. & Schwela, D.H. (1995). *Guidelines for Community Noise*. Geneva: World Health Organization.
- Beschorner, R., Dietz, K., Schauer, N., Mittelbronn, M., Schluesener, H.J., Trautmann, K., Meyermann, R. & Simon, P. (2007a). Expression of EAAT1 reflects a possible neuroprotective function of reactive astrocytes and activated microglia following human traumatic brain injury. *Histol Histopathol.* 22(5):515-26.
- Beschorner, R., Simon, P., Schauer, N., Mittelbronn, M., Schluesener, H.J., Trautmann, K., Dietz, K. & Meyermann, R. (2007b). Reactive astrocytes and

activated microglial cells express EAAT1, but not EAAT2, reflecting a neuroprotective potential following ischaemia. *Histopathology*. 50(7):897-910.

Bhagya, V.R., Srikumar, B.N., Veena, J. & Shankaranarayana Rao, B.S. (2016). Short-Term Exposure to Enriched Environment Rescues Chronic Stress-Induced Impaired Hippocampal Synaptic Plasticity, Anxiety, and Memory Deficits. *Journal of Neuroscience Research* 95, 1602–1610.

Bigdeli, M.R., Hajizadeh, S., Froozandeh, M., Heidarianpour, A., Rasoulzadeh, B., Asgari, A.R., Pourkhalili, K. & Khoshbaten, A. (2008). Normobaric hyperoxia induces ischemic tolerance and upregulation of glutamate transporters in the rat brain and serum TNF-alpha level. *Exp Neurol*. 212(2):298-306.

Bilenko, N., Van Rossem L, Brunekreef, B., Beelen, R., Eeftens, M., Hoek, G., Houthuijs, D., De Jongste, J.C., Van Kempen, E., Koppelman, G.H, Meliefste, K., Oldenwening, M., Smit, H.A., Wijga, A.H. & Gehring, U. (2015). Traffic-related air pollution and noise and children's blood pressure: results from the PIAMA birth cohort study. *Eur J Prev Cardiol*. 22 (1), 4-12.

Birch A.M., McGarry N.B. & Kelly A. (2013). Short-term environmental enrichment, in the absence of exercise, improves memory, and increases NGF concentration, early neuronal survival, and synaptogenesis in the dentate gyrus in a time-dependent manner. *Hippocampus*. 23(6), 437-50.

Blanchard, R.J. & Blanchard, D.C. (1989). Anti-predator defensive behaviors in a visible burrow system. *J. Comp. Psychol*. 103,70–82.

*Brain Research Bulletin*.2017, 135:33.

*brain. Exp. Neurol*. 164, 45–52.

Bredy, T.W., Zhang, T.Y., Grant, R.J., Diorio, J. & Meaney, M.J. (2004). Peripubertal environmental enrichment reverses the effects of maternal care on hippocampal development and glutamate receptor subunit expression. *Eur. J. Neurosci*. 20, 1355–1362.

Bredy, T.W., Zhang, T.Y., Grant, R.J., Diorio, J. & Meaney, M.J. (2004). Peripubertal environmental enrichment reverses the effects of maternal care on hippocampal

- development and glutamate receptor subunit expression. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1355–1362.
- Brenner, M. (2014). Role of GFAP in CNS injuries. *Neuroscience Letters*, 565, 7–13.
- Burda, J. E., & Sofroniew, M. V. (2014). Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*, 81(2), 229–248.
- Bures, Z., Grecova, J., Popelar, J. & Syka, J. (2010). Noise exposure during early development impairs the processing of sound intensity in adult rats. *Eur. J. Neurosci.* 32, 155-164.
- Bureš, Z., Popelář & J., Syka, J. (2016). The effect of noise exposure during the developmental period on the function of the auditory system. *Hearing research*, ISSN: 1878-5891, 352, 1-11.
- Bureš, Z.; Popelář, J. & Syka, J. (2016). The effect of noise exposure during the developmental period on the function of the auditory system. *Hearing research*, ISSN: 1878-5891, 352, 1-11.
- Burgess, N., Maguire, E. A. & O'Keefe, J. (2002). The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron* 35, 625-641.
- Caceres, L.G., Aon Bertolino, L., Saraceno, G.E., Zorrilla Zubilete, M.A., Uran, S.L., Capani, F. & Guelman, L.R. (2010). Hippocampal-related memory deficits and histological damage induced by neonatal ionizing radiation exposure. Role of oxidative status. *Brain Research*. 1312, 67–78.
- Caceres, L.G., Rios H. & Guelman L.R. (2009). Long-lasting effects of neonatal ionizing radiation exposure on spatial memory and anxiety-like behavior. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 895–904.
- Caceres, L.G., Rios, H. & Guelman, L.R. (2009). Long-lasting effects of neonatal ionizing radiation exposure on spatial memory and anxiety-like behavior. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 895-904.
- Campeau, S., Dolan, D., Akil, H. & Watson, S.J. (2002) c-fos mRNA induction in acute and chronic audiogenic stress: possible role of the orbitofrontal cortex in habituation. *Stress* 5 (2), 121–130.

can be induced by passive exposure to moderate-level sounds. *Hear Res* 257, 24–40.

Carobrez, A.P. & Bertoglio, L.J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29, 1193–1205.

Castelo Branco, N. & Alves Pereira, M., (2004). Vibroacoustic disease. *Noise Health* 6, 3-20.

Cechetti, F., Valdeci Worm, P., Lovatel, G., Moysés, F., Rodrigues Siqueira, I. & Netto, C.A. (2013). Environmental enrichment prevents behavioral deficits and oxidative stress caused by chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Life Sciences*. 91 (1–2), 29-36.

Cerbone, A. & Sadile, A.G. (1994). Behavioral habituation to spatial novelty: interference and noninterference studies. *NeurosciBiobehavRev* 18, 497–518.

Chang, E.F. & Merzenich, M.M. (2003). Environmental noise retards auditory cortical development. *Science*, 300, 498–502.

Chang, E.F. & Merzenich, M.M., (2003). Environmental noise retards auditory cortical development. *Science* 300, 498-502.

Chapillon, P., Manneche, C., Belzung, C. & Caston, J. (1999). Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice: 1. Effects on emotional reactivity. *Behav.Genet.* 29, 41–46.

Cheng, L., Wang, S., Chen, Q. & Liao, X. (2011). Moderate noise induced cognition impairment of mice and its underlying mechanisms. *Physiology & Behavior* 104, (5), 981-988.

Cheng, L., Wang, S., Huang, Y. & Liao, X. (2016). The hippocampus may be more susceptible to environmental noise than the auditory cortex. *Hearing Research* 333, 93-97.

Cheng, L., Wang, S.H., Chen, Q.C. & Liao, X.M. (2011). Moderate noise induced cognition impairment of mice and its underlying mechanisms. *Physiol. & Behav.* 104, 981-988.

- Cheng, L., Wang, S.H., Jia, N., Xie, M. & Liao, X.M. (2014). Environmental stimulation influence the cognition of developing mice by inducing changes in oxidative and apoptosis status. *Brain and Development* 36 (1). 51 - 56.
- Muhammad, M.S., Magaji, R.A., Mohammed, A., Isa, A.S. Magaji, M.G. (2016) Effect of resveratrol and environmental enrichment on biomarkers of oxidative stress in young healthy mice. *Metab Brain* 32 (1). 163–170.
- Cherubini, E., Griguoli, M., Safiulina, V. & Lagostena, L. (2011). The depolarizing action of GABA controls early network activity in the developing hippocampus. *Mol Neurobiol.* 43 (2), 97-106.
- Chiovenda, P., Pasqualetti, P., Zappasodi, F., Ercolani, M., Milazzo, D., Tomei, G., Capozzella, A., Tomei, F., Rossini, P.M. & Tecchio, F. (2007) Environmental noise-exposed workers: Event-related potentials, neuropsychological and mood assessment. *International Journal of Psychophysiology* 65, 228–237
- Choi, S.H., & Choi, C.H.(2015) Noise-Induced Neural Degeneration and Therapeutic Effect of Antioxidant Drugs. *Journal of Audiology & Otology*, 19 (3), 111–119.
- Citation data: *Neuroscience letters*, ISSN: 0304-3940, 399, (1-2), 17-22.
- Clark, C.; Crombie, R.; Head, J.; Van Kamp, I.; Van Kempen, E. & Stansfeld, S.A. (2012). Does traffic-related air pollution explain associations of aircraft and road traffic noise exposure on children's health and cognition? A secondary analysis of the United Kingdom sample from the RANCH project. *Am. J. Epidemiol.* 176, 327–337.
- Cole, J.C., & Rodgers, R.J. (1995) Ethological comparison of the effects of diazepam and acute/chronic imipramine on the behaviour of mice in the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 52 (3), 473–478.
- Cong, L., Jing Yang, G., Jin Hong, H., Fu L., Yan, L., Ting Ting, L.V., Li Qin, Z., Qiu Jing, S., Yan Yan, F., Xiang Yang, Z. & Chang Hong, W. (2017). Enriched environment combined with fluoxetine ameliorates depression-like behaviors and hippocampal SYP expression in a rat CUS model.
- Corkin, S. (2002). What's new with the amnesic patient H.M.? *Nature Reviews Neuroscience*, 3, 153-160.

- Costall, B., Hendrie, C.A., Kelly, M.E., & Naylor, R.J. (1987) Actions of sulpiride and tiapride in a simple model of anxiety in mice. *Neuropharmacology*, 26 (2-3), 195–200.
- Costall, B., Jones, B.J., Kelly, M.E., Naylor, R.J., & Tomkins, D.M. (1989) Exploration of mice in a black and white test box: Validation as a model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 32 (3), 777–785.
- Costanzi, M., Cannas, S., Saraulli, D., Rossi-Arnaud, C. & Cestari, V. (2011) Extinction after retrieval: effects on the associative and nonassociative components of remote contextual fear memory. *Learn Mem* 18, 508–518.
- Crofton, E.J., Zhang, Y. & Green, T.A. (2015) Inoculation Stress Hypothesis of Environmental Enrichment. *Neurosci Biobehav Rev.* 0, 19–31.
- Cui, B. & Li, K. (2013). Chronic noise exposure and Alzheimer disease: Is there an etiological association? *Med. Hypotheses* 81, 623-626.
- Cui, B., Wu, M. & She, X. (2009). Effects of Chronic Noise Exposure on Spatial Learning and Memory of Rats in Relation to Neurotransmitters and NMDAR2B Alteration in the Hippocampus. *Journal of Occupational Health* 51 (2).
- Daenen, E.W.P.M., Van der Heyden, J.A., Kruse, C.G., Wolterink, G. & Van Ree, J.M. (2001). Adaptation and habituation to an open field and responses to various stressful events in animals with neonatal lesions in the amygdala or ventral hippocampus. *Brain Res.* 918, 153–165.
- Dahlqvist, P., Ronnback, A., Bergstrom, S.A., Soderstrom, I. & Olsson, T. (2004). Environmental enrichment reverses learning impairment in the Morris water maze after focal cerebral ischemia in rats. *Eur. J. Neurosci.* 19, 2288–2298.
- Dallos, P. (1992). The Active Cochlea. *The Journal of Neuroscience* f2 (12), 4575-4585.
- Dandi, E., Kalamari, A., Touloumi, O., Lagoudaki, R., Nousiopoulou, E., Simeonidou, C., Spandou, E. & Tata, D.A. (2018). Beneficial effects of environmental enrichment on behavior, stress reactivity and synaptophysin/BDNF expression in hippocampus following early life stress. *Int J Dev Neurosci.* 67, 19-32.

- Darcy, A.E., Hancock, L.E. & Ware, E.J. (2008). A descriptive study of noise in the neonatal intensive care unit. Ambient levels and perceptions of contributing factors. *Adv. Neonatal. Care Off. J. Natl. Assoc. Neonatal.Nurses* 8, 165-175.
- De Souza, T.C.F., Périssé, A.R.S. & Moura M. (2015). Noise exposure and hypertension: investigation of a silent relationship. *BMC Public Health*. 15, 328.
- Dehne, N., Lautermann, J., Ten Cate, W.J., Rauert, U. & de Groot, H. (2000). In vitro effects of hydrogen peroxide on the cochlear neurosensory epithelium of the guinea pig. *Hear. Res.* 143, 162-170.
- Diamond, M. C. (1966). Increases in cortical depth and glia numbers in rats subjected to enriched environment. *J. Comp. Neurol.* 128, 117–126.
- Diamond, M.C., Krech, D. & Rosenzweig, M.R. (1964). The effects of an enriched environment on the histology of the rat cerebral cortex. *The Journal of comparative neurology* 123, 111–120.
- Dixon, L.M., Sparks, N.H.C., & Rutherford, K.M.D. (2016). Early experiences matter: a review of the effects of prenatal environment on offspring characteristics in poultry. *Poultry Science* 95 (3), 489–499.
- Dreger, S., Meyer, N., Fromme, H. & Bolte, G. (2015). Environmental noise and incident mental health problems: A prospective cohort study among school children in Germany. *Environ Res.* 143 49-54.
- Driver, A.S., Kodavanti, P.R. & Mundy, W.R. (2000). Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. *Neurotoxicol.Teratol.* 22 (2), 175–181.
- Duffy, S.N., Craddock, K.J. & Nguyen, P.V. (2001). Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus-dependent memory. *Learn. Mem.* 8, 26–34.
- Duffy, S.N., Craddock, K.J., Abel, T. & Nguyen, P.V. (2001) Environmental Enrichment Modifies the PKA-Dependence of Hippocampal LTP and Improves Hippocampus-Dependent Memory. *Learning & memory* 8, 26–34.
- Duffy, S.N.; Craddock, K.J.; Abel, T. & Nguyen, P.V. (2001). Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP



- Ehninger, D. & Kempermann, G. (2003). Regional effects of wheel running and environmental enrichment on cell genesis and microglia proliferation in the adult murine neocortex. *Cereb.Cortex* 13, 845–851.
- Eichenbaum, H., Stewart, C. & Morris, R.G. (1990). Hippocampal representation in place learning. *J Neurosci* 10, 3531-3542.
- Eng, L. F., & Ghirnikar, R. S. (1994). GFAP and Astrogliosis. *Brain Pathology*, 4(3), 229–237.
- Engert, F. & Bonhoeffer, T. (1999). Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399, 66–70.
- Ennaceur, A. (2014 Tests of unconditioned anxiety — Pitfalls and disappointments. *Physiology & Behavior* 135, 55–71.
- enrichment in the hippocampus and cerebral cortex of male and female rats. *Brain Res.* 1613, 120-9.
- Eraslan, E., Akyazi, I., Ergül Ekiz, E. & Matur, E. (2015). Noise stress changes mRNA expressions of corticotropin-releasing hormone, its receptors in amygdala, and anxiety-related behaviors. *Noise Health.* 17 (76), 141–147.
- Erlander, M.G., Tillakaratne, N.J., Feldblum, S., Patel, N. & Tobin, A.J. (1991). Two genes encode distinct glutamatedecarboxylases. *Neuron* 7, 91–100.
- Escorihuela, R., Fernández Teruel, A., Gil, L., Aguilar, R., Tobeña, A. & Driscoll, P. (1999). Inbred Roman High- and Low-Avoidance Rats. *Physiology & Behavior*, 67 (1), 19–26.
- Evans, G.W., Lercher, P., Meis, M., Ising, H. & Kofler, W.W. (2001). Community noise exposure and stress in children. *J Acoust Soc Am.* 109, 1023–1027.
- Faherty, C.J., Kerley, D. & Smeyne, R.J. (2003). A Golgi–Cox morphological analysis of neuronal changes induced by environmental enrichment. 141, 55–61.
- Falkenberg, T. (1992). Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat is associated with improved spatial memory and enriched environment. *Neurosci.Lett.*138, 153–156.
- Fanselow, M.S. & Dong, H. (2010). Are The Dorsal and Ventral Hippocampus functionally distinct structures?.*Neuron.* 14. 65 (1), 7.

- Fares, R.P., Belmeguenai, A., Sanchez, P.E. (2013). Standardized Environmental Enrichment Supports Enhanced Brain Plasticity in Healthy Rats and Prevents Cognitive Impairment in Epileptic Rats. Lei S, ed. PLoS ONE. 8(1), e53888.
- Fetoni, A.R., De Bartolo, P., Eramo, S.L.M., Rolesi, R., Paciello, F., & Bergamini, C., Fato, R., Paludetti, G., Petrosini, L. & Troiani, D. (2013). Noise-Induced Hearing Loss (NIHL). as a target of oxidative stress-mediated damage: cochlear and cortical responses after an increase in antioxidant defense, J. Neurosci. 33 (9), 4011–4023.
- Fetoni, A.R., Paciello, F., Rolesi, R., Eramo, S.L.M., Mancuso, C., Troiani, D. & Paludetti, G. (2015). Rosmarinic acid up-regulates the noise-activated Nrf2/HO-1 pathway and protects against noise-induced injury in rat cochlea. Free Rad. Biol. and Med. 85, 269-281.
- Fetoni, A.R., Paciello, F., Rolesi, R., Eramo, S.L.M., Mancuso, C., Troiani, D. & Paludetti, G. (2015). Rosmarinic acid up-regulates the noise-activated Nrf2/HO-1 pathway and protects against noise-induced injury in rat cochlea, Free Rad.Biol. and Med. 85 269–281.
- Finkel, T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. Current Opinion in Cell Biology 15, 247–254.
- Fiorenza, N.G., Rosa, J., Izquierdo, I. & Myskiw, J.C. (2012). Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas. BehavBrain Res 232, 210–216.
- Fischer, F. & Peduzzi, J. (2007). Functional recovery in rats with chronic spinal cord injuries after exposure to an enriched environment. J Spinal Cord Med 30, 147–55.
- Fishell, G., Rudy, B. (2011). Mechanisms of inhibition within the telencephalon: "where the wild things are". Annu Rev Neurosci. 34, 535-67.
- flexibility in Radial Arm Water Maze. Neuroendocrinology Letters Volume 31 No. 4.
- Fogari, R., Zoppi, A. , Vanasia, A., Marasi, G. & Villa, G. (1994). Occupational noise exposure and blood pressure. Journal of Hypertension 12 (4), 475-479. Lutman, M.E. (2000 What Is the Risk of Noise-Induced Hearing Loss at 80, 85, 90 dB(A). and Above? Occupational Medicine Volume 50 (4), 274–275.

- Fonseca, J., Martins dos Santos, J., Oliveira, P., Laranjeira, N. & Castelo Branco, N.A. (2012). Noise-induced duodenal lesions: a light and electron microscopy study of the lesions of the rat duodenal mucosa exposed to low frequency noise. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 36(1), 72-77.
- Foster, T.C. & Dumas, T.C. (2001). Mechanism for increased hippocampal synaptic strength following differential experience. *J. Neurophysiol.* 85, 1377–1383.
- Freeman, S., Khvoles, R. Cherny, L. & Sohmer, H. (1999). Effect of Long-Term Noise Exposure on the Developing and Developed Ear in the Rat. *Audiol Neurotol* 4, 207–218.
- Frick, K.M. & Fernandez, S.M. (2003). Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiol. Aging* 24, 615–626.
- Leggio, M.G., Mandolesi, L., Federico, F., Spirito, F., Ricci, B., Gelfo, F. & Petrosini, L. (2005). Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav. Brain Res.* 163, 78–90.
- Friske, J. E. & Gammie, S. C. (2005). Environmental enrichment alters plus maze, but not maternal defense performance in mice. *Physiol. Behav.* 85, 187–194.
- Fujimoto, C. & Yamasoba, T. (2014). Oxidative stresses and mitochondrial dysfunction in age-related hearing loss. *Oxid. Med. and Cell. Longev.* ArticleID 582849.
- Furman, A.C., Kujawa, S.G. & Liberman, M.C. (2013). Noise-induced cochlear neuropathy is selective for fibers with low spontaneous rates. *J. Neurophysiol.* 110 (3), 577–586.
- Gannouni, N., Mhamdi, A., Tebourbi, O., El May, M., Sakly, M. & Rhouma, K.B., (2013) Qualitative and quantitative assessment of noise at moderate intensities on extra-auditory system in adult rats. *NoiseHealth* 15 (67), 406–411.
- Gao, C., Zhu, W., Tian, L., Zhang, J. & Li, Z. (2015). MCT4-Mediated Expression of EAAT1 is Involved in the Resistance to Hypoxia Injury in Astrocyte–Neuron co-Cultures. *Neurochem Res* 40(4):818-28.
- Gentile, A.M. & Beheshti, Z. (1987). Enrichment versus exercise effects on motor impairments following cortical removals in rats. *Behav. Neural Biol.* 47, 321–332.

- Globus, A., Rosenzweig, M.R., Bennett, E.L. & Diamond, M.C., (1973). Effects of differential experience on dendritic spine counts in rat cerebral cortex. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 82, 175–181.
- Glorieux, C., Zamocky, M., Sandoval, J.M., Verrax, J., & Calderon, P.B. (2015). Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radical Biology and Medicine* 87, 84–97.
- Godoy, J.R., Funke, M., Ackermann, W., Haunhorst, P., Oesteritz, S., Capani, F., Elsässer, H.P. & Lillig, C.H. (2011). Redox atlas of the mouse. Immunohistochemical detection of glutaredoxin-, peroxiredoxin-, and thioredoxin-family proteins in various tissues of the laboratory mouse. *Biochim Biophys Acta.* 1810 (1), 2-92.
- Gourévitch, B., Edeline, J.M., Occelli, F. & Eggermont, J.J. (2014). Is the din really harmless? Long term effects of non-traumatic noise on the adult auditory system. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 483–491.
- Graybeal, C., Kiselycznyk, C., & Holmes, A. (2012) Stress-Induced Deficits in Cognition and Emotionality: A Role for Glutamate. *Current Topics in Behavioral Neurosciences* 12, 189–207.
- Grecova, J., Bures, Z., Popelar, J., Suta D. & Syka, J. (2009). Brief exposure of juvenile rats to noise impairs the development of the response properties of inferior colliculus neurons. *Eur. J. Neurosci.* 29, 1921-1930.
- Greenough, W.T., Volkmar, F.R. & Juraska, J.M., (1973). Effects of rearing complexity on dendritic branching in frontolateral and temporal cortex of the rat. 41, 371–378.
- Griebel, G., Moreau, J.L., Jenck, F., Misslin, R. & Martin J.R. (1994). Acute and chronic treatment with 5-HT reuptake inhibitors differentially modulate emotional responses in anxiety models in rodents. *Psychopharmacology* 113, 463-470.
- Guelman, L. R., Zorrilla Z., M. A., Rios, H. and Zieher, L. M., 2003. WR-2721 (Amifostine, Ethyol®). prevents motor and morphological changes induced by neonatal x-irradiation. *Neurochemistry Int.* 42 (5), 385-391.

- Guelman, L.R., Cabana, J.I., Del Luján Pagotto, R.M. & Zieher, L.M. (2005). Ionizing radiation-induced damage on developing cerebellar granule cells cultures can be prevented by an early amifostine post-treatment. *Int J Dev Neurosci.* 23 (1), 1-7.
- Halassa, M.M., Florian, C., Fellin, T., Munoz, J.R. & Lee, S.Y. (2009). Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. *Neuron* 61, 213–19.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th Edn., Oxford, Clarendon Press.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141, 312-322.
- Hamm, R.J. Temple, M.D., O'Dell, D.M., Pike, B.R. & Lyeth, B.G. (1996). Exposure to environmental complexity promotes recovery of cognitive function after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 13, 41–47.
- Handley, S.L., Mcblane, J.W., Critchley, M. & Njunge, K. (1993). Multiple serotonin mechanisms in animal models of anxiety: environmental, emotional and cognitive factors. *BehavBrain Res* 58, 203-210.
- Hanschmann, E.A., Godoy, J.R., Berndt, C., Hudemann, C. & Lillig, C.H. (2013) Thioredoxins, Glutaredoxins, and Peroxiredoxins—Molecular Mechanisms and Health Significance: from Cofactors to Antioxidants to Redox Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling* 19, nº 13.
- Hardingham, G.E. & Bading, H. (2003). The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci.* 26 (2), 81–89.
- Haydar, T.F., Wang, F., Schwartz, M.L. & Rakic, P. (2000). Differential modulation of proliferation in the neocorticalventricular and subventricular zones. *J. Neurosci.* 20, 5764–5774.
- Haydon, P.G. (2001). GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 185–193.
- He, S., Ma, J., Liu, N. & Yu, X. (2010). Early Enriched Environment Promotes Neonatal GABAergic Neurotransmission and Accelerates Synapse Maturation. *J of Neurosci*, 30 (23). 7910-7916.

- Hebb, D. (1947). The effects of early experience on problem-solving at maturity. *Am. Psychol.* 2, 306-307.
- Heim, C. & Nemeroff, C.B. (1999). The impact of early adverse experiences on brain systems involved in the pathophysiology of anxiety and affective disorders. *Biol. Psychiatry.* 46, 1509–1522.
- Heisler, L.K., Chu, H.M., Brennan, T.J., Danao, J.A., Bajwa, P. & Parsons, L.H. (1998). Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 15049–54.
- Henderson, D., Bielefeld, E.C. & Harris, K.C. (2006). The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. *Ear Hear*, 27, 1–19.
- Henderson, D., Bielefeld, E.C., Harris, K.C., Hu, B.H. (2006). The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. *Ear Hear* 27, 1–19.
- Herring, A., Yasin, H., Ambrée, O., Sachser N., Paulus, W. & Keyvani, K. (2008). Environmental enrichment counteracts Alzheimer's neurovascular dysfunction in TgCRND8 mice. *Brain Pathol* 18, 32-39.
- Hertz, L. & Zielke, H.R. (2004). Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends Neurosci.* 27, 735–43.
- Hertz, L., Xu, J., Song, D., Yan, E., Gu, L. & Peng, L. (2013). Astrocytic and neuronal accumulation of elevated extracellular K<sup>(p)</sup>. with a 2/3 K<sup>(p)</sup>/Na<sup>(p)</sup>. flux ratio- consequences for energy metabolism, osmolarity and higher brain function. *Front Comput Neurosci.* 7, 114.
- Hicks, R.R., Zhang, L., Atkinson, A., Stevenon, M., Veneracion, M. & Seroogy, K.B. (2002). Environmental enrichment attenuates cognitive deficits but does not alter neurotrophin gene expression in the hippocampus following lateral fluid percussion brain injury. *Neuroscience* 112, 631–637.
- hippocampus and medial prefrontal cortex. *Neuroscience Letters* 399 17–22.
- hippocampus: a comparison of dorsal, ventral and complete hippocampal cytotoxic lesions. *Behav Neurosci* 113, 1170–88.
- hippocampus: spatial memory and hyponeophagia. *Behav Neurosci* 116, 884–901.

- Hjortebjerg, D., Andersen, A.M.N., Christensen, J.S. (2016). Exposure to Road Traffic Noise and Behavioral Problems in 7-Year-Old Children: A Cohort Study. *Environmental Health Perspectives*. 124 (2),228-234.
- Hoffman, A.N., Parga, A., Paode, P., Watterson, L.R., Nikulina, E.M., Hammer, R. P., & Conrad, C.D. (2015). Chronic stress enhanced fear memories are associated with increased amygdala zif268 mRNA expression and are resistant to reconsolidation. *Neurobiology of Learning and Memory* 120, 61–68.
- Horvath, G., Reglodi, D., Vadasz, G., Farkas, J. & Kiss, P. (2013). Exposure to Enriched Environment Decreases Neurobehavioral Deficits Induced by Neonatal Glutamate Toxicity. *Int J Mol Sci*. 214 (9), 19054–19066.
- Huet Bello, O., Ruvalcaba Delgadillo, Y., Feria Velasco, A. (2017). Environmental Noise Exposure Modifies Astrocyte Morphology in Hippocampus of Young Male Rats. *Noise & Health*. 19 (90), 239-244.
- Hygge, S. Evans, G.W. & Bullinger, M. (2002). A prospective study of some effects of aircraft noise on cognitive performance in schoolchildren. *Psychological science* 13 (5).Stansfeld, S.A., Berglund, B. & Clark, C. (2005). Aircraft and road traffic noise and children's cognition and health: a cross-national study. *Lancet*. 365, 1942–9.
- Ickes, B. R. (2000). Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat
- Insanally, M.N., Albanna, B.F. & Bao, S. (2010). Pulsed noise experience disrupts complex sound representations. *J. Neurophysiol*. 103, 2611-2617.
- Ising, H. & Kruppa, B. (2004). Health effects caused by noise: evidence in the literature from the past 25 years. *Noise Health*. 6,5–13.
- ISSN 1734-1140
- Izquierdo, I. & Medina, J.H. (1997). Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol. Learn. Mem.* 68, 285–316.
- Izquierdo, I., Bevilaqua, L.R., Rossato, J.I., Bonini, J.S., Medina, J.H. & Cammarota M. (2003). Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *TrendsNeurosci* 29, 496–505.

- Izquierdo, I., da Cunha, C., Rosat, R., Ferreira, M.B.C., Jerusalinsky, D., & Medina, J.H. (1992). Neurotransmitter receptors involved in memory processing by the amygdala, medial septum and hippocampus of rats. *Behav. Neural Biol.* 58, 16–25.
- Izquierdo, I., Furini, C.R.G. & Myskiw, J.C. (2016) Fear memory. *Physiol. Rev.* 96, 695-750.
- Jadavji, N.M., Kolb, B. & Metz, G.A. (2006). Enriched environment improves motor function in intact and unilateral dopamine-depleted rats. *Neuroscience* 140, 1127–1138.
- Jankowsky, J.L., Xu, G., Fromholt, D., Gonzales, V. & Borchelt, D.R. (2003). Environmental enrichment exacerbates amyloid plaque formation in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 1220–1227.
- Janus, C., Koperwas, J.S., Janus, M. & Roder, J. (1995). Rearing environment and radial maze exploration in mice. *Behavioural Processes* Volume 34 (2). 129-140.
- Jáuregui Huerta, F., García Estrada, J., Ruvalcaba Delgadillo, Y., Trujillo, X., Huerta, M., Feria Velasco, A., Gonzalez Perez, O. & Luquín, S. (2011). Chronic exposure of juvenile rats to environmental noise impairs hippocampal cell proliferation in adulthood. *Noise Health* 13, 286-91.
- Jáuregui Huerta, F., García Estrada, J., Ruvalcaba Delgadillo, Y., Trujillo, X., Huerta, M., Feria Velasco, A., Gonzalez Perez, O. & Luquín, S. (2011). Chronic exposure of juvenile rats to environmental noise impairs hippocampal cell proliferation in adulthood. *Noise Health* 13, 286-91.
- Jauregui Huerta, F., Ruvalcaba Delgadillo, Y., Garcia Estrada, J., Feria Velasco, A., Ramos Zuñiga, R., Gonzalez Perez, O. & Luquin, S. (2010). Early exposure to noise followed by predator stress in adulthood impairs the rat's re-learning
- Jiang, C., Xu, X., Yu, L., Xu, J. & Zhang, J. (2015). Environmental enrichment rescues the degraded auditory temporal resolution of cortical neurons induced by early noise exposure. *Eur. J. Neurosci.* 42 (5), 2144–2154.



- Johansson, B. B. & Ohlsson, A. (1996). Environment, social interaction, and physical activity as determinants of functional outcome after cerebral infarction in the rat. *Exp. Neurol.* 139, 322–327.
- Johansson, B.B. & Belichenko, P.V. (2002). Neuronal plasticity and dendritic spines: effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22, 89–96.
- Johansson, B.B. (1996). Functional outcome in rats transferred to an enriched environment 15 days after focal brain ischemia. *Stroke* 27, 324–326.
- Jung, C. & Herms, J. (2014). Structural dynamics of dendritic spines are influenced by an environmental enrichment: an in vivo imaging study. *Cereb Cortex* 24, 377–84.
- Kamogashira, T., Fujimoto, C., & Yamasoba, T. (2015). Reactive Oxygen Species, Apoptosis, and Mitochondrial Dysfunction in Hearing Loss. *BioMed Research International*, 617207.
- Kanjo, E. (2010). NoiseSPY: a real-time mobile phone platform for urban noise monitoring and mapping. *Mobile Networks and Applications*, 15 (4), 575-588.
- Katsel, P., Byne, W., Roussos, P., Tan, W., Siever, L. & Haroutunian, V. (2011). Astrocyte and glutamate markers in the superficial, deep, and white matter layers of the anterior cingulate gyrus in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 36 1171–1177.
- Kempermann, G., Kuhn, H. G. & Gage, F. H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493–495.
- Kempermann, G., Kuhn, H. G. & Gage, F. H. (1998). Experience induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *Journal of Neuroscience* 18 (9). 3206-3212
- Kent, W.D., Tan, A.K., Clarke, M.C. & Bardell, T. (2002). Excessive noise levels in the neonatal ICU: potential effects on auditory system development. *J Otolaryngol* 31, 355–360.
- Kentner, A. C., Khoury, A., Lima Queiroz, E., & MacRae, M. (2016). Environmental enrichment rescues the effects of early life inflammation on markers of synaptic transmission and plasticity. *Brain, Behavior, and Immunity*, 57, 151–160.

- Kim, M., Chang, S.I., Seong, J.C., Holt, J.B., Park, T.H. & Ko, J.H. (2012). Road traffic noise: annoyance, sleep disturbance, and public health implications. *Am J PrevMed* 43, 353–360.
- Kim, S., Lee, S., Ryu, S., Suk, J., & Park, C. (2002) Comparative analysis of the anxiety-related behaviors in four inbred mice. *Behavioural Processes*, 60(2), 181–190.
- Kjelstrup, K.G. (2002). Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10825-10830.
- Knieling, M., Metz, G., Antonow Schlorke, I. (2009). Enriched environment promotes efficiency of compensatory movements after cerebral ischemia in rats. *Neuroscience* 163, 759–69.
- Kolb, B., Myschasiuk, R. & Gibb, R. (2013). Brain Development, Experience, and Behavior. *Pediatric Blood & Cancer* 61 (10), 1720-1723.
- Kondo, M., Takei, Y., & Hirokawa, N. (2012) Motor Protein KIF1A Is Essential for Hippocampal Synaptogenesis and Learning Enhancement in an Enriched Environment. *Neuron*, 73 (4), 743–757.
- Konings, L., Van Laer, L. & Van Camp, G., (2009). Genetic Studies on Noise-Induced Hearing Loss: A Review. *Ear & Hearing* 30, 151-159.
- Koo, J., Park, C. & Choi, S. (2003). Postnatal environment can counteract prenatal effects on cognitive ability, cell proliferation, and synaptic protein expression 17, 1556.
- Kopke, R.D., Jackson, R.L., Coleman, J.K.M., Liu, J., Bielefeld, E.C. & Balough, B.J. (2007). NAC for noise: From the bench top to the clinic. *Hear. Res.* 226 (1-2), 114-125.
- Kotloski, R.J. & Sutula, T.P. (2015) Environmental enrichment: Evidence for an unexpected therapeutic influence. *Experimental Neurology* 264, 121–126.
- Kraus, K.S., Mitra, S., Jimenez, Z., Hinduja, S., Ding, D., Jiang, H., Gray, L., Lobarinas, E., Sun, W. & Salvi, R.J. (2011). Noise Trauma Impairs Neurogenesis in the Rat Hippocampus. *Neuroscience*. Author manuscript.

- Krech, D., Rosenzweig, M.R. & Bennett, E.L. (1962). Relations between chemistry and problem-solving among rats raised in enriched and impoverished environments. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 55, 801-807.
- Kujawa, S.G. & Liberman, M.C. (2006). Acceleration of age-related hearing loss by early noise exposure: evidence of a missed youth. *J. Neurosci.* 26 (7), 2115–2123.
- Kujawa, S.G. & Liberman, M.C. (2009). Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after temporary noise-induced hearing loss. *J. Neurosci.* 29 (45), 14077–14085.
- Kujawa, S.G. & Liberman, M.C. (2009). Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after temporary noise-induced hearing loss. *J. Neurosci.* 29 (45), 14077–14085.
- Kumar, S. (2011). Free Radicals and Antioxidants: Human and Food System. *Adv. Appl. Sci. Res.* 2, 129–135.
- Kurioka, T., Matsunobu, T., Satoh, Y., Niwa, K. & Shiotani, A. (2014). Inhaled hydrogen gas therapy for prevention of noise-induced hearing loss through reducing reactive oxygen species *Neurosci. Res.* 89, 69-74.
- Kyriakou, E., Manfré, G., Spadaro, J., Nguyen, H.P., Van der Harst, J.E. & Homberg, J.R. (2017) Anxiety and risk assessment-related traits in a rat model of Spinocerebellar ataxia type 17. *Behavioural Brain Research* 321, 106–112.
- Lara, E., Beltrán, J.Q., Segovia, J. & Gutiérrez, R. (2012) Granule cells born in the adult rat hippocampus can regulate the expression of GABAergic markers. *Exp Neurol.* 237 (1), 134-41.
- Lau, A., Tymianski, M. (2010) Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflügers Arch.* 460, 525–542.
- Laviola, G., Hannan, A.J., Macri, S., Solinas, M., Jaber, M. (2008). Effects of enriched environment on animal models of neuro- degenerative diseases and psychiatric disorders. *Neurobiol. Dis.* 31 (2), 159–168.

- Laviola, G., Rea, M. & Morley Fletcher, S. (2004). Beneficial effects of enriched environment on adolescent rats from stressed pregnancies. *Eur J Neurosci* 20, 1655–64.
- Lázár, R., Orvos, H., Szöllősi, R. & Varga, I.S. (2015). The quality of the antioxidant defence system in term and preterm twin neonates, *Redox Report*, 20 (3). , 103-108.
- Le Prell, C.G., Dolan, D.F., Schacht, J., Miller, J.M., Lomax, M.I. & Altschuler, R.A. (2003). Pathways for protection from noise induced hearing loss. *Noise Health* 5, 1- 17.
- Le Prell, C.G., Hughes, L.F. & Miller, J.M. (2007). Free radical scavengers, vitamins A, C, and E plus magnesium reduce noise trauma, *Free Radic. Biol. Med.* 42 (9) 1454–1463.
- LeDoux, J. (2012) Rethinking the Emotional Brain. *Neuron* 73 (4), 653-676.
- Lee, E.H.Y., Hsu, W.L., Ma, Y.L., Lee, P.J. & Chao, C.C. (2003). Enrichment enhances the expression of sgk, a glucocorticoid-induced gene, and facilitates spatial learning through glutamate AMPA receptor mediation. *European Journal of Neuroscience* 18 (10), 2842-2852.
- Lee, J., Gu, J., Park, H., Yun, H., Kim, S. & Lee, W. (2014). Estimation of populations exposed to road traffic noise in districts of Seoul metropolitan area of Korea. *Int J Environ Res Public Health*. 11, 2729–2740.
- Lee, J.H., Lee, J.M., Shim, C.S., Bhang, S.Y. & Jung, K.S. (2012). The Health Effects of the Noise (II). Incheon: National Institute of Environmental Research.
- Leggio, M.G. (2005). Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav. Brain Res.* 163, 78–90.
- Leinekugel, X., Tseeb, V., Ben Ari, Y. & Bregestovski, P. (1995). Synaptic GABA A activation induces Ca<sup>2+</sup> rise in pyramidal cells and interneurons from rat neonatal hippocampal slices. *J. Physiol. (Lond.)*. 487, 319–329.
- Lenzi, P., Frenzilli, G., Gesi, M., Ferrucci, M., Lazzeri, G., Forna, F. & Nigro, M. (2003). DNA damage associated with ultrastructural alterations in rat myocardium after loud noise exposure, *Environ. Health Perspect.* 111. 467–471.

- Leussis, M.P. & Bolivar, V.J. (2006). Habituation in rodents: A review of behavior, neurobiology, and genetics. *NeurosciBiobehav Rev* 30, 1045–1064.
- Lever, C., Burton, S. & O'Keefe, J. (2006). Rearing on Hind Legs, Environmental Novelty, and the Hippocampal Formation. *Reviews in the Neurosciences* 17, 111–133.
- Levi, O., Jongen-Relo, A.L., Feldon, J., Roses, A.D. & Michaelson, D.M. (2003). ApoE4 impairs hippocampal plasticity isoform-specifically and blocks the environmental stimulation of synaptogenesis and memory. *Neurobiol.Dis.* 13, 273–282.
- Levy, G.D., Woolston, D.J., Browne, J.V. (2003). Mean noise amounts in level II vs level III neonatal intensive care units. *Neonatal Netw* 22, 33–38.
- Li, D., Ropert, N., Koulakoff, A., Giaume, C. & Oheim, M. (2008). Lysosomes are the major vesicular compartment undergoing Ca<sup>2+</sup> regulated exocytosis from cortical astrocytes. *J. Neurosci.* 28, 7648–7658.
- Li, M., Wang, M. & Ding, S. (2012). Environmental enrichment during gestation improves behavior consequences and synaptic plasticity in hippocampus of prenatal-stressed offspring rats. *Acta Histochem Cytochem* 45, 157–66
- Liang, S.L., Carlson, G.C. & Coulter, D.A. (2006). Dynamic regulation of synaptic GABA release by the glutamate-glutamine cycle in hippocampal area CA1. *J. Neurosci.* 26, 8537–48.
- Lima, A.P.A.S., Silva, K., Padovan, C.M., Sousa Almeida, S. & Hebihara Fukuda, M.T. (2014). Memory, learning, and participation of the cholinergic system in young rats exposed to environmental enrichment. *Behavioural Brain Research* 259, 247–252.
- Lin, M.H., Takahashi, M.P., Takahashi, Y. & Tsumoto, T. (1994). Intracellular calcium increase induced by GABA in visual cortex of fetal and neonatal rats and its disappearance with development. *Neurosci. Res.* 20, 85–94.
- Linne, M.L. & Jalonen, T.O. (2014). Astrocyte-neuron interactions: from experimental research-based models to translational medicine. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 123, 191–217.

- Lipton, S.A. (2008). NMDA receptor activity regulates transcription of antioxidant pathways. *Nat Neurosci* 11 (4), 381–382.
- Lister, R. (1990). Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol. Ther.* 46, 321–340.
- Liu, C., Fuertes, E., Tiesler, C.M., Birk, M., Babisch, W., Bauer, C.P., Koletzko, S., Von Berg, A., Hoffmann, B. & Heinrich, J. (2014). The associations between traffic-related air pollution and noise with blood pressure in children: results from the GINIplus and LISAplus studies. *Int J Hyg Environ Health* 217(4-5), 499-505.
- Liu, H., Pecka, J.L., Zhang, Q., Soukup, G.A., Beisel, K.W. & He, D.Z.Z. (2014). Characterization of Transcriptomes of Cochlear Inner and Outer Hair Cells. *The Journal of Neuroscience*. 34 (33), 11085-11095.
- Liu, L., Shen, P., He, T. (2016). Noise induced hearing loss impairs spatial learning/memory and hippocampal neurogenesis in mice. *Scientific Reports*. 6, 20374.
- Liu, N., He, S., & Yu, X. (2012). Early Natural Stimulation through Environmental Enrichment Accelerates Neuronal Development in the Mouse Dentate Gyrus. *PLoS ONE*, 7 (1), e30803.
- Livi, S., Pica, G., Carrus, G., Rullo, M. & Gentile, M. (2018). Motivated Shield From Chronic Noise Environment: Moderation of the Relationship Between Noise Sensitivity and Work Wellbeing by Need for Closure. *Front. Psychol.* 9, 663.
- Livi, S., Pica, G., Carrus, G., Rullo, M. & Gentile, M. (2018). Motivated Shield From Chronic Noise Environment: Moderation of the Relationship Between Noise Sensitivity and Work Wellbeing by Need for Closure. *Front. Psychol.* 9, 663.
- Livingston Thomas, J., Nelson, P., Karthikeyan, S., Antonescu, S., Jeffers, M.S. & Marzolini, S. (2016) Exercise and Environmental Enrichment as Enablers of Task-Specific Neuroplasticity and Stroke Recovery. *Neurotherapeutics* 13 (2), 395–402.
- Llorente, R., Villa, P., Marco, E.M. & Viveros, M.P. (2012). Analyzing the effects of a single episode of neonatal maternal deprivation on metabolite profiles in rat brain: a proton nuclear magnetic resonance spectroscopy study. *Neuroscience* 201, 12-19.

- Lobo, V.; Patil, A.; Phatak, A. & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharm. Rev.* 4, 118–126.
- Lores Arnaiz, S., Bustamante, J., Arismendi, M., Vilas, S., Paglia, N., Basso, N., Capani, F., Coirini, H., Costa, J.J. & Arnaiz, M.R. (2006). Extensive enriched environments protect old rats from the aging dependent impairment of spatial cognition, synaptic plasticity and nitric oxide production. *Behav. Brain Res.* 169 (2), 294–302.
- LoTurco, J.J., Owens, D.F., Heath, M.J.S., Davis, M.B.E. & Kriegstein, A.R. (1995). GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* 15, 1287–1298.
- Lu, J. & Holmgren, A. (2014). The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine*, 66, 75–87.
- Lui, C., Wang, J. & Tain, Y. (2011). Prenatal stress in rat causes longterm spatial memory deficit and hippocampus MRI abnormality: differential effects of postweaning enriched environment. *Neurochem Int* 58, 434–441.
- Lyst, S.J., Davis, K. Gigg, J. & Hager, R. (2012). Effects of Increased Spatial Complexity on Behavioural Development and Task Performance in Lister Hooded Rats. *PLoS One*. 7 (10), e47640.
- Ma, Y.H., Su, N., Chao, X.D., Zhang, Y.Q., Zhang, L., Han, F., Luo, P., Fei, Z. & Qu, Y. (2012). Thioredoxin-1 attenuates post-ischemic neuronal apoptosis via reducing oxidative/nitrative stress. *Neurochem Int.* 60 (5), 475-83.
- Maguire, E. Burgess, N., Donnet, J.G., Frackowiak, R.S.J., Frith, C.D. & O'Keefe, J. (1998). Knowing where and getting there: a human navigation network. *Science* 280, 921-924.
- Maguire, E.A., Burgess, N. & O'Keefe, J. (1999). Human spatial navigation: cognitive maps, sexual dimorphism, and neural substrates. *Curr Opin Neurobiol* 9, 171-177.
- Mahendra Prashanth, K.V. & Sridhar, V., (2008). The relationship between noise frequency components and physical, physiological and psychological effects of industrial workers. *Noise Health* 10, 90-98.

- Maison, S.F., Usubuchi, H. & Liberman, M.C. (2013). Efferent feedback minimizes cochlear neuropathy from moderate noise exposure. *J. Neurosci.* 33 (13), 5542–5552.
- Malin, E.L. & McGaugh, J.L. (2006). Differential involvement of the hippocampus, anterior cingulate cortex, and basolateral amygdala in memory for context and footshock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (6), 1959–1963.
- Manikandan, S., Padma, M.K., Srikumar, R., Parthasarathy, N.J., Muthuvel, A. & Devi, R.S. (2006). Effects of chronic noise stress on spatial memory of rats in relation to neuronal dendritic alteration and free radical-imbalance in
- Mannström, P., Kirkegaard, M. & Ulfendahl, M. (2015). Repeated Moderate Noise Exposure in the Rat, an Early Adulthood Noise Exposure Model. *JARO: Journal of the Association for Research in Otolaryngology*. 16(6), 763-772.
- Maric, D. (2001). GABA expression dominates neuronal lineage progression in the embryonic rat neocortex and facilitates neurite outgrowth via GABAA autoreceptor/Cl<sup>-</sup> channels. *J. Neurosci.* 21, 2343–2360.
- Mármol, F., Sánchez, J. Torres, M.N. & Chamizob, V.D. (2017). Environmental enrichment in the absence of wheel running produces beneficial behavioural and anti-oxidative effects in rats. *Behav Processes*. 144, 66-71.
- Mármol, F., Rodríguez, C.A., Sánchez, J. & Chamizob, V.D. (2015). Anti-oxidative effects produced by environmental
- Martindale, J.L. & Holbrook, N.J. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 192, 1–15.
- Massaad, C.A., & Klann, E. (2011). Reactive Oxygen Species in the Regulation of Synaptic Plasticity and Memory. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14 (10), 2013–2054.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis Davies, G.C., Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429, 761–766.



- Mattison, H.A., Popovkina, D., Kao, J.P.Y. & Thompson, S.M. (2014) The role of glutamate in the morphological and physiological development of dendritic spines. *Eur J Neurosci.* 39 (11), 1761–1770.
- McCreary, J.K. & Metz, G.A.S. (2016). Environmental enrichment as an intervention for adverse health outcomes of prenatal stress. *Environ. Epigenet.* 2 (3), dvw013.
- McFarland, D., (1987). *The Oxford Companion to Animal Behaviour.* New York. Oxford University Press.
- McHugh, S.B., Deacon, R.M.J., Rawlins, J.N.P. & Bannerman, D.M. (2004). Amygdala and ventral hippocampal lesions contribute differentially to mechanisms of fear and anxiety. *Behav Neurosci* 118, 63–78.
- Melcher, J.R. & Kiang, N.Y., (1996). Generators of the brainstem auditory evoked potential in cat. III. Identified cell populations. *Hear. Res.* 93 (1–2), 52–71.
- Mellott, T.J., Williams, C.L., Meck, W.H. & Blusztajn, J.K. (2004). Prenatal choline supplementation advances hippocampal development and enhances MAPK and CREB activation. *FASEB. J.* 18, 545–547.
- Mennerick, S., Benz, A. & Zorumski, C.F. (1996). Components of glial responses to exogenous and synaptic glutamate in rat hippocampal microcultures. *J Neurosci* 16, 55–64.
- Michael, T., Blechert, J., Vriends, N., Margraf, J. & Wilhelm, F.H. (2007) Fear Conditioning in Panic Disorder: Enhanced Resistance to Extinction. *Journal of Abnormal Psychology.* 116 (3), 612–617.
- Middeldorp, J., & Hol, E. M. (2011). GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology*, 93(3), 421–443.
- Mikics, E., Barsy, B., Barsvári B. & Haller, J. (2005). Behavioral specificity of non-genomic glucocorticoid effects in rats: Effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open-field. *Hormones and Behavior* 48, 152 – 162.
- Mitra, R. & Sapolsky, R.M. (2012). Short-Term Enrichment Makes Male Rats More Attractive, More Defensive and Alters Hypothalamic Neurons. *PLoS One.* 7 (5), e36092.

- Mohammed, A.K., Winblad, B., Ebendal, T. & Lärkfors, L. (1990). Environmental influence on behaviour and nerve growth factor in the brain. *Brain Res.* 528, 62–72. *J. Neurosci.* 18, 3206–3212.
- Molina, S.J., Miceli, M. & Guelman, L.R., (2016). Noise exposure and oxidative balance in auditory and extra-auditory structures in adult and developing animals. Pharmacological approaches aimed to minimize its effects. *Pharmacol. Res.* 109, 86-91.
- Mora, F., Segovia, G. & del Arco, A. (2007). Aging, plasticity and environmental enrichment: Structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Research Reviews* 55 (1), 78-88.
- Morata, T.C., Fiorini, A.C., Fischer, F.M., Fischer, F.M., Gozzoli, L. & Colacioppo, S. (2001). Factors affecting the use of hearing protectors in a population of printing workers. *NoiseHealth* 4, 25-32.
- Morris, R. G., Garrud, P., Rawlins, J. N. & O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681-683.
- Morris, R.G., Schenk, F., Tweedie, F. & Jarrard, L.E. (1990). Ibotenate Lesions of Hippocampus and/or Subiculum: Dissociating Components of Allocentric Spatial Learning. *Eur J Neurosci* 2, 1016-1028.
- Moser, E.I., Moser, M.B. & Andersen, P. (1993). Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci* 13, 3916–25.
- Moser, M.B. & Moser, E.I. (1998). Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8, 608–19.
- Mukwevho, R., Ferreira, Z. & Ayeleso, A. (2014). Potential Role of Sulfur-Containing Antioxidant Systems in Highly Oxidative Environments. *Molecules* 19, 19376-19389.
- Munzel, T., Gori, T., Babisch, W. & Basner, M. (2014). Cardiovascular effects of environmental noise exposure. *Eur. Heart J.* 35, 829-836.

- Mychasiuk, R., Zahir, S., Schmold, N., Ilnytsky, S., Kovalchuk, O., & Gibb, R. (2012). Parental enrichment and offspring development: Modifications to brain, behavior and the epigenome. *Behavioural Brain Research* 228 (2), 294–298.
- Myskiw, J.C. & Izquierdo, I. (2012). Posterior parietal cortex and long-term memory: some data from laboratory animals. *Front IntegrNeurosci* 6, 8.
- Naka, F., Narita, N., Okado, N. & Narita, M. (2005). Modification of AMPA receptor properties following environmental enrichment. *Brain Dev.* 27, 275–278.
- Nakamura, H., Kobayashi, S., Ohashi, Y. & Ando, S. (1999). Agechanges of brain synapses and synaptic plasticity in response to an enriched environment. *J. Neurosci. Res.* 56, 307–315.
- Naqvi, F., Haider, S., Batool, Z., Perveen, T. & Haleem, D.J. (2012). Sub-chronic exposure to noise affects locomotor activity and produces anxiogenic and depressive-like behavior in rats. *Pharmacological Reports* 64, 64–69
- National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH (1998). Criteria for a recommended standard: occupational noise exposure. NIOSH Publication No. 98, 126.
- Neale, S.A., Copeland, C.S. & Salt, T.E. (2013 Effect of VGLUT inhibitors on glutamatergic synaptic transmission in the rodent hippocampus and prefrontal cortex. *Neurochem Int.* 73, 159-65.
- Netto, C.A. & Izquierdo, I. (1985). On how passive is inhibitory avoidance. *Behav Neural Biol.* 43, 327–330.
- Neves, J. D., Vizuete, A. F., Nicola, F., Da Ré, C., Rodrigues, A. F., Schmitz, F., ... Netto, C. A. (2018). Glial glutamate transporters expression, glutamate uptake, and oxidative stress in an experimental rat model of intracerebral hemorrhage. *Neurochemistry International*, 116, 13–21.
- Nguyen, D., Alavi, M. V., Kim, K.-Y., Kang, T., Scott, R. T., Noh, Y. H., ... Ju, W.-K. (2011). A new vicious cycle involving glutamate excitotoxicity, oxidative stress and mitochondrial dynamics. *Cell Death & Disease*, 2(12), e240.

- Nithianantharajah, J., Levis, H. & Murphy, M. (2004). Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. *Neurobiol. Learn. Mem.* 81, 200–210.
- O'Keefe, J. & Nadel, L. (1978) *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Clarendon Press, Oxford.
- of reactivity to spatial and non-spatial novelty in mice. *Neuroscience* 93, 855–867.
- Ohlemiller, K.K. (2008). Recent findings and emerging questions in cochlear noise injury. *Hear Res*, 245, 5–17.
- Ohlemiller, K.K., McFadden, S.L., Ding, D.L., Flood, D.G., Reaume, A.G., Hoffman, E.K., Scott, R.W., Wright, J.S., Putcha, G.V. & Salvi, R.J. (1999). Targeted deletion of the cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase gene (*Sod1*). increases susceptibility to noise induced hearing loss. *Audiol. Neurotol* 4, 237-246.
- Ohrstrom, E., Hadzibajramovic, E. & Holmes, E. (2006). Effects of road traffic noise on sleep: studies on children and adults. *J Environ Psychol.* 26, 116–26.
- O'Keefe, J. & Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34, 171-175.
- O'Keefe, J. & Nadel, L. (1978). *The hippocampus as a cognitive map*. Clarendon Press.
- Olaosun, A.O., Ogundiran, O., & Tobih, J. E. (2009) Health hazards of noise: a review article. *Res. J. Sci.* 3, 115–122.
- Olney, J.W. (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164, 719–721.
- Ouda, L., Burianova, J., Balogova, Z., Lu, H.P. & Syka, J. (2014). Structural changes in the adult rat auditory system induced by brief postnatal noise exposure. *Brain Struct.Funct.*
- Owens, D.F., Boyce, L.H., Davis, M.B.E. & Kriegstein, A.R. (1996). Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated patch recordings and calcium imaging. *J. Neurosci.* 16, 6414–6423.
- Owusu-Ansah, E. & Banerjee, U. (2009). Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature* 461, 537-541.

- Paban, V., Jaffard, M., Chambon, C., Malafosse, M. & Alescio-Lautier, B. (2005). Time course of behavioral changes following basal forebrain cholinergic damage in rats: environmental enrichment as a therapeutic intervention. *Neuroscience* 132, 13–32.
- Packard, M.G. & Cahill, L. (2001). Affective modulation of multiple memory systems. *Current Opinion in Neurobiology* 11 (6), 752-756.
- Paez Martinez, N., Flores Serrano, Z., Ortiz Lopez, L. & Ramirez Rodriguez, G. (2013). Environmental enrichment increases doublecortin-associated new neurons and decreases neuronal death without modifying anxiety-like behavior in mice chronically exposed to toluene. *Behav Brain Res.* 1, (256). 432-40.
- Pan, F., Lu, C.Y., Song, J., Jing, H., Li, Q., Yu, H. & Chen, X. (2006). Different duration of crowding and noise exposure effects on exploratory behavior, cellular immunity and HSP70 expression in rats. *Stress & Health* 22 (4), 257-262.
- Parkin, G. M., Udawela, M., Gibbons, A., & Dean, B. (2018). Glutamate transporters, EAAT1 and EAAT2, are potentially important in the pathophysiology and treatment of schizophrenia and affective disorders. *World Journal of Psychiatry*, 8(2), 51–63.
- Paunović, K., Stansfeld, S. & Clark, C. (2011). Epidemiological studies on noise and blood pressure in children: observations and suggestions. *Environ Int.* 37, 1030–41.
- Pekny, M., Wilhelmsson, U., & Pekna, M. (2014). The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neuroscience Letters*, 565, 30–38.
- Pentkowski, N.S., Blanchard, D.C., Lever, C., Litvin, Y. & Blanchard, R.J. (2006). Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. *Eur J Neurosci* 23, 2185-2196.
- Petrosini, L., De Bartolo, P., Foti, F., Gelfo, F., Cutuli, D., Leggio, M. G. & Mandolesi, L. (2009). On whether the environmental enrichment may provide cognitive and brain reserves. *Brain Res. Rev.* 61 (2), 221–239.
- Pfrieger, F.W. & Barres, B.A. (1996). New views on synapse-glia interactions. *Curr Opin Neurobiol* 6, 615–621.

- Pham, T.M., Söderström, S., Winblad, B. & Mohammed, A.H. (1999). Effects of environmental enrichment on cognitive function and hippocampal NGF in the non-handled rats. *Behav Brain Res.* 103 (1), 63-70.
- Pienkowski, M. & Eggermont, J. J. (2012). Reversible longterm changes in auditory processing in mature auditory cortex in the absence of hearing loss induced by passive, moderate level sound exposure. *Ear Hear.* 33, 305–314.
- Pienkowski, M., & Eggermont, J. J. (2009). Long-term, partially-reversible organization of frequency tuning in mature cat primary auditory cortex
- Pienkowski, M., & Eggermont, J.J. (2010). Intermittent exposure with moderate level sound impairs central auditory function of mature animals without concomitant hearing loss. *Hear Res.* 261, 30–35.
- Pienkowski, M., Munguia, R. & Eggermont, J. J. (2011). Passive exposure of adult cats to bandlimited tone pip ensembles or noise leads to long-term response suppression in auditory cortex. *Hear. Res.* 277, 117–126.
- Pierson, M. & Li, D. (1996). Cochlear integrity in rats with experimentally induced audiogenic seizure susceptibility. *Hear. Res.* 101, 7-13.
- Pinaud, R., Penner, M.R., Robertson, H.A. & Currie, R.W. (2001). Upregulation of the immediate early gene arc in the brains of rats exposed to environmental enrichment: implications for molecular plasticity. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 91, 50–56.
- Pirra, S., De Valck, E. & Cluydts, R. (2010). Nocturnal road traffic noise: a review on its assessment and consequences on sleep and health. *Environ Int.* 36 (5), 492–498.
- Plack, C.J., Barker, D. & Prendergast, G. (2014). Perceptual Consequences of “Hidden” Hearing Loss. *Trends in Hearing* 18, 1–11.
- Plitman, E., Nakajima, S., De la Fuente Sandoval, C., Gerretsen, P., Chakravarty, M. M., Kobylanski, J. & Graff-Guerrero, A. (2014) Glutamate-mediated excitotoxicity in schizophrenia: A review. *European Neuropsychopharmacology : The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 24 (10), 1591–1605.

- Poletti, S., Bollettini, I., Lorenzi, C., Vitali, A., Brioschi, S., Serretti, A., Colombo, C. & Benedetti, F. (2018). White Matter Microstructure in Bipolar Disorder Is Influenced by the Interaction between a Glutamate Transporter EAAT1 Gene Variant and Early Stress. *Mol Neurobiol*. In press.
- Ponomarev, I., Rau, V., Eger, E.I., Harris, R.D. & Fanselow, P.S. (2010) Amygdala Transcriptome and Cellular Mechanisms Underlying Stress-Enhanced Fear Learning in a Rat Model of Posttraumatic Stress Disorder. *Neuropsychopharmacology* 35, 1402–1411.
- Popović, N., Caballero Bleda, M. & Popović, M. (2014). Post-Training Scopolamine Treatment Induced Maladaptive Behavior in Open Field Habituation Task in Rats. *PLoS ONE* 9(6): e100348.
- Porter, J.T. & McCarthy, K.D. (1997). Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog Neurobiol* 51, 439–455.
- Pourova, J., Kottova, M., Voprsalova, M. & Pour, M. (2010). Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. *Acta Physiol* 198, 15-35.
- Pourova, J., Kottova, M., Voprsalova, M. & Pour, M. (2010). Reactive oxygen and nitrogenspecies in normal physiological processes, *Acta Physiol*. 198, 15–35.
- Pouyatos, B., Gearhart, C.A. & Fechter, L.A. (2005). Acrylonitrile potentiates hearing loss and cochlear damage induced by moderate noise exposure in rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 204 (1), 46–56.
- Rabat, A. (2007). Extra-auditory effects of noise in laboratory 1 animals: the relationship between noise and sleep. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 46(1), 35-41.
- Rabat, A. Bouyer, J.J., George, o., Le Moal, M. & Mayo, W. (2006). Chronic exposure of rats to noise: Relationship between long-term memory deficits and slow wave sleep disturbances. *Behavioural Brain Research* 171, 303–312
- Rahimi, O. & Claiborne, B.J. (2007). Morphological development and maturation of granule neuron dendrites in the rat dentate gyrus. *Prog Brain Res*. 163,167-81.
- Ravindran, R., Devi, R.D., Samson, J. & Senthivelan, M. (2005). Noise-Stress-Induced Brain Neurotransmitter Changes and the Effect of Ocimum sanctum (Linn). *Treatment in Albino Rats.J Pharmacol Sci* 98, 354 – 360.

- Rawlins, J.N. & Olton, D.S. (1982). The septo-hippocampal system and cognitive mapping. *Behav Brain Res* 5, 331-358.
- Rebec, G.V., Grabner, C.P., Johnson, M., Pierce, R.C. & Bardo, M.T. (1997). Transient increases in catecholaminergic activity in medial prefrontal cortex and nucleus accumbens shell during novelty. *Neuroscience*. 76,707–714.
- Renner, M.J. & Rosenzweig, M.R. (1987). *Enriched and Impoverished Environments*; Springer-Verlag: New York.
- Reshef, R., Kreisel, T., Beroukhim Kay, D. & Yirmiya, R. (2014). Microglia and their CX3CR1 signaling are involved in hippocampal- but not olfactory bulb-related memory and neurogenesis. *Brain, Behavior, and Immunity*. 41, 239-250.
- Restivo, L. et al. Enriched environment promotes behavioral and morphological recovery in a mouse model for the fragile X syndrome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 11557–11562 (2005).
- Rice, D. & Barone, S. (2000). Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models. *Environmental Health Perspectives* 108 (3).
- Risold, P.Y. & Swanson, L.W. (1996). Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus. *Science* 272, 1484-1486.
- Roberts, R.C., Roche, J.K. & McCullumsmith, R.E. (2014) Localization of excitatory amino acid transporters EAAT1 and EAAT2 in human postmortem cortex: a light and electron microscopic study. *Neuroscience*, 277, 522–540.
- Rodgers, R.J. & Johnson, N.J.T. (1995) Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 52 (2), 297–303.
- Roozendaal, B. & McGaugh, J.L. (2011). Memory modulation. *Behavioral Neuroscience*, 125 (6), 797–824.
- Rose, C.R. & Karus, C. (2013). Two sides of the same coin: sodium homeostasis and signaling in astrocytes under physiological and pathophysiological conditions. *Glia*. 61 (8), 1191–1205.



- Rosenberg, P.A., Amin, S. & Leitner, M. (1992). Glutamate uptake disguises neurotoxic potency of glutamate agonists in cerebral cortex in dissociated cell cultures. *J Neurosci* 12, 56–61.
- Rosenzweig, M. R. (1966). Environmental complexity, cerebral change, and behavior. *Am. Psychol.* 21, 321–332.
- Rosenzweig, M. R., Krech, D., Bennett, E. L. & Diamond, M. C. (1962). Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 55, 429–437.
- Rothstein, J.D., Dykes Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P. & Welty, D.F. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16, 675–686.
- Roy, V. & Chapillon, P., (2004). Further evidences that risk assessment and object exploration behaviours are useful to evaluate emotional reactivity in rodents. *Behav. Brain Res.* 154, 439–448.
- Rubio Casillas, A. & Fernández Guasti, A. (2016) The dose makes the poison: from glutamatemediated neurogenesis to neuronal atrophy and depression. *Rev Neurosci.* 27 (6), 599-622.
- Ruvalcaba Delgadillo, Y., Luquín, S., Ramos Zúñiga, R. (2015). Early-life exposure to noise reduces mPFC astrocyte numbers and T-maze alternation/discrimination task performance in adult male rats. *Noise & Health.* 17 (77), 216-226.
- Rybalko, N. & Syka, J. (2001). Susceptibility to noise exposure during postnatal development in rats. *Hear. Res.* 155, 32-40.
- Rybalko, N., Bures, Z., Burianova, J., Popelar, J., Grecova, J. & Syka, J. (2011). Noise exposure during early development influences the acoustic startle reflex in adult rats. *Physiol. Behav.* 102, 453-458.
- Rybalko, N., Chumak, T., Bures, Z., Popelar, J., Suta, D. & Syka, J., (2015). Development of the acoustic startle response in rats and its change after early acoustic trauma. *Behav. Brain Res.* 286, 212-221.

- Rybalko, N., Chumak, T., Bures, Z., Popelar, J., Suta, D. & Syka, J., (2015). Development of the acoustic startle response in rats and its change after early acoustic trauma. *Behav. Brain Res.* 286, 212-221.
- Saha, S., Gandhi, A., Das, S., Kaur, P. & Singh, S.H. (1996). Effect of noise stress on some cardiovascular parameters and audiovisual reaction time. *Indian J Physiol Pharmacol.* 40(1), 35-40.
- Sakurai, Y. (2002). Coding of auditory temporal and pitch information by hippocampal individual cells and cell assemblies in the rat. *Neuroscience* 115 (4), 1153–1163.
- Sale, A., Berardi, N., & Maffei, L. (2009). Enrich the environment to empower the brain. *Trends in Neurosciences* 32 (4), 233–239.
- Säljö, A., Mayorga, M., Bolouri, H., Svensson, B., & Hamberger, A. (2011). Mechanisms and pathophysiology of the low-level blast brain injury in animal models. *NeuroImage*, 54, S83–S88.
- Salomons, A.R., Arndt, S.S. & Ohi, F. (2012) Impact of anxiety profiles on cognitive performance in BALB/c and 129P2 mice. *Cognitive, Affective & Behavioral Neuroscience*, 12 (4), 794–803.
- Sampedro-Piquero, P. & Begega, A. (2017). Environmental Enrichment as a Positive Behavioral Intervention Across the Lifespan. *Current Neuropharmacology* 15, 459-470.
- Samson, J., Sheeladevi, R. & Ravindran, R. (2007). Oxidative stress in brain and antioxidant activity of *Ocimum sanctum* in noise exposure. *NeuroToxicology* 28, 679-685.
- Samson, J., Wiktorek-Smagur, A., Politanski, P., Rajkowska, E., Pawlaczyk-Luszczynska, M., Dudarewicz, A., Sha, S.H., Schacht, J. & Sliwinska-Kowalska, M. (2008). Noise-induced time-dependent changes in oxidative stress in the mouse cochlea and attenuation by D-methionine. *Neuroscience*. 152 (1), 146-50.
- Sanz, L., Murillo Cuesta, S., Cobo, P., Cediñel Algivia, R., Contreras, J., Rivera, T., Varela Nieto, I. & Avendaño, C. (2015). Swept-sine noise-induced damage as a hearing loss model for preclinical assays. *Front. Aging Neurosci.* 7, 7.

- Sargolini, F., Roullet, P., Oliverio, A. & Mele, A. (1999) Effects of lesions to
- Sasse, S.K., Greenwood, B.N., Masini, C.V., Nyhuis, T.J., Fleshner, M., Day, H.E. & Campeau, S., (2008). Chronic voluntary wheel running facilitates corticosterone response habituation to repeated audiogenic stress exposure in male rats. *Stress* 11 (6), 425–437.
- Sathyasaikumar, K.V., Swapna, I., Reddy, P.V., Murthy, Ch.R., Dutta Gupta, A., Senthilkumaran, B. & Reddanna, P. (2007) Fulminant hepatic failure in rats induces oxidative stress differentially in cerebral cortex, cerebellum and pons medulla. *Neurochem. Res.* 32 (3), 517-524.
- Saunders, J.C., Dear, S.P. & Schneider, M.E. (1985). The anatomical consequences of acoustic injury: a review and tutorial. *J. Acoust. Soc. Am.* 78 (3), 833–860.
- Schmitt, W.B., Deacon, R.M., Seeburg, P.H., Rawlins, J.N. & Bannerman, D.M.A. (2003). Within-subjects, within-task demonstration of intact spatial reference memory and impaired spatial working memory in glutamate receptor-A-deficient mice. *J Neurosci* 23, 3953-3959.
- Schousboe, A., Westergaard, N., Waagepetersen, H.S., Larsson, O.M., Bakken, I.J. & Sonnewald, U. (1997). Trafficking between glia and neurons of TCAcycle intermediates and related metabolites. *Glia* 21, 99–105.
- Schrijver, N.C.A., Bahr, N.I., Weiss, I.C., Wurbel, H. (2002). Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 209–224.
- Schrijvera, N.C.A., Bahrb, N.I., Weissb, I.C. & Würbel, H. (2002). Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 73, 209 – 224.
- Schwabe, L. & Wolf, O.T. (2012) Stress Modulates the Engagement of Multiple Memory Systems in Classification Learning. *The Journal of Neuroscience*, August 32 (32), 11042–11049.

- Schwabe, L., Joëls, M., Roozendaal, B., Wolf, O.T. & Oitzld, M.S. (2012) Stress effects on memory: An update and integration. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 36 (7), 1740-1749.
- Scoville, W.B. & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol NeurosurgPsychiatry* 20, 11–21.
- Segovia, G., Yagüe, A.G., García-Verdugo, J.M. & Mora, F. (2006). Environmental enrichment promotes neurogenesis and changes the extracellular concentrations of glutamate and GABA in the hippocampus of aged rats. *Brain Res. Bull.* 70, 8–14.
- Segovia, G., Yagüe, A.G., García-Verdugo, J.M. & Mora, F. (2006). Environmental enrichment promotes neurogenesis and changes the extracellular concentrations of glutamate and GABA in the hippocampus of aged rats. *Brain Res. Bull.* 70, 8–14.
- Seidman, M.D. & Standring, R.T. (2010). Noise and Quality of Life. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7, 3730-3738.
- Setem, J. (1999) Ethopharmacological Analysis of 5-HT Ligands on the Rat Elevated Plus-Maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 62 (3), 515–521.
- Shepherd, J.K., Grewal, S.S., Fletcher, A., Bill, D.J., & Dourish, C.T. (1994) Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated “zero-maze” as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology*, 116 (1), 56–64.
- Shi, L., Guo, X., Shen, P., Liu, L., Tao, S., Li, X., Song, Q., Yu, Z., Yin, S. & Wang, J. (2015). Noise-induced damage to ribbon synapses without permanent threshold shifts in neonatal mice. *Neuroscience* 304, 368-377.
- Shilpa, B.M., Bhagya V., Harish, G., Srinivas Bharath, M.M. & Shankaranarayana Rao, B.S. (2017). Environmental enrichment ameliorates chronic immobilisation stress-induced spatial learning deficits and restores the expression of BDNF, VEGF, GFAP and glucocorticoid receptors. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 76, 88–100.
- Shin, L.M. & Liberzon, I. (2010) The Neurocircuitry of Fear, Stress, and Anxiety Disorders. *Neuropsychopharmacology* 35 (1), 169–191.

- Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*. 4, 180-183.
- Silva, R.C., & Brandão, M. . (2000). Acute and Chronic Effects of Gepirone and Fluoxetine in Rats Tested in the Elevated Plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 65(2), 209–216.
- Siti, H.N., Kamisah, Y. & Kamsiah, J. (2015). The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review *Vascular Pharmacology* 71 (2015). 40–56.
- Smith, S.J. (1998). Glia help synapses form and function. *Curr Biol*8, R158—R160.
- Sonneveld, U., Westergaard, N. & Schousboe, A. (1997). Glutamate transport and metabolism in astrocytes. *Glia* 21, 56–63.
- Spear, L.P. (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 417–463.
- Spear, L.P. (2015). Adolescent alcohol exposure: Are there separable vulnerable periods within adolescence? *Physiology & behavior* 148, 122-130.
- Starosciak, A.K., Zakharova, E., Stagg, M., Matos, J. & Izenwasser, S. (2012). Differential alteration of the effects of MDMA (ecstasy). on locomotor activity and cocaine conditioned place preference in male adolescent rats by social and environmental enrichment. *Psychopharmacology*. 224(1).: 101-108.
- Speechley, W.J., Hogsden, J.L. & Dringenberg, H.C. (2007). Continuous white noise exposure during and after auditory critical period differentially alters bidirectional thalamocortical plasticity in rat auditory cortex in vivo. *The European Journal of Neuroscience* 26, 2576–2584.
- Speisman, R.B., Kumar, A., Rani, A., Pastoriza, J.M., Severance, J.E., Foster, T.C. & Ormerod, B.K. (2013) Environmental enrichment restores neurogenesis and rapid acquisition in aged rats. *Neurobiol Aging*. 34 (1), 263-74.
- Stansfeld, S. & Clark, C. (2015). Health Effects of Noise Exposure in Children. *Curr Envir Health Rpt* 2, 171–178.
- Stansfeld, S. & Clark, C. (2015). Health Effects of Noise Exposure in Children. *Curr Envir Health Rpt* 2, 171–178

- Steiner, J., Brisch, R., Schiltz, K., Dobrowolny, H., Mawrin, C., Krzyżanowska, M., Gos, T. (2016). GABAergic system impairment in the hippocampus and superior temporal gyrus of patients with paranoid schizophrenia: A post-mortem study. *Schizophrenia Research*, 177(1-3), 10–17.
- Stojanovic, I.R., Kostic, M. & Ljubisavljevic & S. J Neural Transm (2014). The role of glutamate and its receptors in multiple sclerosis. *Journal of Neural Transmission* 121, 945-955.
- Stote, D.L. & Fanselow, M.S. (2014). NMDA receptor modulation of incidental learning in Pavlovian contextconditioning. *Behavioral Neuroscience* 118, 253–257.
- Barrientos, R.M., O'Reilly, R.C. & Rudy, J.W. (2002). Memory for context is impaired by injecting anisomycin into dorsal hippocampus following context exploration. *Behav Brain Res* 134, 299–306.
- Strange, B.A., Witter, M.P., Lein, E.S., Moser, E. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat Rev Neurosci*. 15(10), 655-69.
- Sun, W., Tang, L. & Allman, B.L., (2011). Environmental noise affects auditory temporal processing development and NMDA-2B receptor expression in auditory cortex. *Behav. Brain Res*. 218, 15-20.
- Sundaramahalingam, M., Ramasundaram, S., Rathinasamy, S.D., Natarajan, R.P. & Somasundaram, T. (2013) Role of *Acorus calamus* and  $\alpha$ -asarone on Hippocampal Dependent Memory in Noise Stress Exposed Rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 16, 770-778.
- Sundaramahalingam, M; Moorthy, K.P., Ramasundaram, S., Narayanaperumal, J.P., Arumugam, M. & Rathinasamy, S.D. (2006). Effects of chronic noise stress on spatial memory of rats in relation to neuronal dendritic alteration and free radical-imbalance in hippocampus and medial prefrontal cortex.
- Sundstrom, E., Town, J., Rice, R., Osborn, D., & Brill, M. (1994). Office noise, satisfaction, and performance. *Environ. Behav.* 26, 195–222.
- suprachiasmatic nucleus in depression. *Brain Structure & Function*, 222(9), 4079–4088.

- Suta, D., Rybalko, N., Shen, D.W., Popelar, J., Poon, P.W.F. & Syka, J. (2015). Frequency discrimination in rats exposed to noise as juveniles. *Physiol. Behav.* 144, 60-65.
- Swcatt, J.D. (2010). Mechanisms of memory. The hippocampus serves a role in multimodal information processing, and memory consolidation. Second Edition. Elsevier Inc. London, UK.
- Sweatt, J.D. (2010). Mechanisms of Memory. Second edition. JAcademic Press
- Syka, J. (2002). Plastic changes in the central auditory system after hearing loss, restoration of function, and during learning. *Physiol. Rev.* 82, 601–636.
- Szabadfi, K., Atlasz, T., Horváth, G., Kiss, P., Hamza, L., Farkas, J., Reglődi, D. (2009). Early postnatal enriched environment decreases retinal degeneration induced by monosodium glutamate treatment in rats. *Brain Research*, 1259, 107-112.
- Tamminga, C.A., Southcott, S., Sacco, C., Wagner, A.D. & Ghose, S. (2012). Glutamate Dysfunction in Hippocampus: Relevance of Dentate Gyrus and CA3 Signaling. *Schizophrenia Bulletin* 38 (5). 927–935.
- Tamura, H., Ohgami, N., Yajima, I., Iida, M., Ohgami, K., Fujii, N., Itabe, H., Kusudo, T., Yamashita, H. & Kato, M. (2012). Chronic exposure to low frequency noise at moderate levels causes impaired balance in mice. *PLoS ONE* 7(6), e39807.
- Tang, Y.P., Wang, H., Feng, R., Kyin, M., & Tsien, J. . (2001) Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology*, 41 (6), 779–790.
- Tannenbaum, J. & Bennett, B.T. (2015). Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 54, 120–132.
- Tanti, A., & Belzung, C. (2013). Neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus: Are depression and the action of antidepressants region-specific? *Neuroscience* 252, 234–252.

- Tanti, A., Rainer, Q., Minier, F., Surget, A., & Belzung, C. (2012). Differential environmental regulation of neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus. *Neuropharmacology* 63 (3), 374–384.
- Tanti, A., Westphal, W.P., Girault, V., Brizard, B., Leguisquet, S.D.A.M., Surget, A & Belzung, C. (2013). Region-dependent and stage-specific effects of stress, environmental enrichment and antidepressant treatment on hippocampal neurogenesis. *Hippocampus* 23, 797–811.
- the glutamatergic afferents to the nucleus accumbens in the modulation
- Theodosios, D.T., Poulain, D.A. & Oliet, S.H. (2008). Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol. Rev.* 88 (3), 983-1008.
- Tiesler, C.M., Birk, M., Thiering, E., Kohlböck, G., Koletzko, S., Bauer, C.P., Berdel D, Von Berg, A., Babisch, W. & Heinrich, J. (2013). Exposure to road traffic noise and children's behavioural problems and sleep disturbance: results from the GINIplus and LISAplus studies. *Environ Res.* 123, 1-8.
- Tillerson, J.L., Caudle, W.M., Reveron, M.E. & Miller, G.W. (2003). Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson's disease. *Neuroscience* 119, 899–911.
- Torasdöter, M., Metsis, M., Henriksson, B.G., Winblad, B. & Mohammed, A.H. (1998). Environmental enrichment results in higher levels of nerve growth factor mRNA in the rat visual cortex and hippocampus. *Behav. Brain Res.* 93, 83–90.
- Torasdöter, M., Metsis, M., Henriksson, B.G., Winblad, B. & Mohammed, A.H. (1996). Expression of neurotrophin-3 mRNA in the rat visual cortex and hippocampus is influenced by environmental conditions. *Neurosci. Lett.* 218, 107–110.
- Tovote, P., Fadok, J.P. & Lüthi, A. (2017) Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat Rev Neurosci.* 16 (6), 317-31.
- Trapanotto, M., Benini, F., Farina, M., Gobber, D., Magnavita, V. & Zacchello F. (2004). Behavioural and physiological reactivity to noise in the newborn. *J. Paediatr. Child Health* 40, 275-281.



- Turner, A.M. & Greenough, W.T. (1985). Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. I. Synaptic and neuronal density and synapses per neuron. *Brain Res.* 329, 195–203.
- Uran, S.L., Aon Bertolino, L., Caceres, L.G., Capani, F. & Guelman, L.R. (2012). Rat hippocampal alterations could underlie behavioral abnormalities induced by exposure to moderate noise levels. *Brain Res.* 1471, 1–12.
- Uran, S.L., Aon Bertolino, L., Caceres, L.G., Capani, F. & Guelman, L.R. (2012). Rat hippocampal alterations could underlie behavioral abnormalities induced by exposure to moderate noise levels. *Brain Res.* 1471, 1–12.
- Uran, S.L., Caceres, L.G. & Guelman, L.R. (2010). Effects of loud noise on hippocampal and cerebellar-related behaviors. Role of oxidative state. *Brain Res.* 1361, 102–114.
- Uran, S.L., Caceres, L.G. & Guelman, L.R. (2010). Effects of loud noise on hippocampal and cerebellar-related behaviors. Role of oxidative state. *Brain Res.* 1361, 102–114.
- Uran, S.L., Gomez Casati, M.E. & Guelman, L.R. (2014). Long-term recovery from hippocampal related behavioral and biochemical abnormalities induced by noise exposure during brain development. Evaluation of auditory pathway integrity. *Int. J. Dev. Neurosci.* 37, 41–51.
- Uran, S.L., Gómez-Casati, M.E. & Guelman, L.R. (2014). Long-term recovery from hippocampal-related behavioral and biochemical abnormalities induced by noise exposure during brain development. Evaluation of auditory pathway integrity. *International Journal of Developmental Neuroscience* 37, 41-51
- Uttara, B., Singh, A.V., Zamboni, P. & Mahajan, R.T., (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol.* 7, 65-74.
- Valero Aracama, M.J., Sauvage, M.M., & Yoshida, M. (2015). Environmental enrichment modulates intrinsic cellular excitability of hippocampal CA1 pyramidal cells in a housing duration and anatomical location-dependent manner. *Behavioural Brain Research* 292, 209–218.

- Vallejo-Illarramendi, A., Domercq, M., Pérez-Cerdá, F., Ravid, R. & Matute, C. (2006). Increased expression and function of glutamate transporters in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis.* 21(1):154-64.
- Van Dellen, A. & Hannan, A.J. (2004). Genetic and environmental factors in the pathogenesis of Huntington's disease. *Neurogenetics* 5, 9–17.
- Van Dellen, A., Blakemore, C., Deacon, R., York, D. & Hannan, A. J. (2000). Delaying the onset of Huntington's in mice. *Nature* 404, 721–722.
- Van Kamp I & Davies H. (2013). Noise and health invulnerable groups: areview. *Noise Health.* 15,153–9.
- Van Kempen, E.; Fischer, P.; Janssen, N.; Houthuijs, D.; van Kamp, I.; Stansfeld, S. & Cassee, F. (2012). Neurobehavioral effects of exposure to traffic-related air pollution and transportation noise inprimary schoolchildren. *Environ. Res.*, 115, 18–25.
- Van Praag, H., Kempermann, G. & Gage, F. H. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in theadult mouse dentate gyrus. *Nature Neurosci.* 2, 266–270.
- Van Strien, N.M., Cappaert, N.L.M. & Witter, M.P. (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal–hippocampal network. *Nature Reviews Neuroscience* 10,272–282
- Van Waas, M., & Soffié, M. (1996). Differential environmental modulations on locomotor activity, exploration and spatial behaviour in young and old rats. *Physiology & Behavior* 59 (2), 265–271.
- Venero, C., Guadaño Ferraz, A., Herrero, A.I., Nordström, K., Manzano, J., Moreale de Escobar, G., bernal, J. & Vennström, B. (2005 Anxiety, memory impairment, and locomotor dysfunction caused by a mutant thyroid hormone receptor  $\alpha 1$  can be ameliorated by T3 treatment. *Genes & Dev.* 19, 2152-2163.
- Ventura, R. & Harris, K.M. (1999). Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J. Neurosci.* 19, 6897–906.
- Verkhatsky, A. & Parpura V. (2010). Recent advances in (patho).physiology of astroglia. *Acta Pharmacol Sin.* 31(9). 1044–1054.

- Viet, S.M, Dellarco, M., Dearborn, D.G. & Neitzel, R. (2014). Assessment of Noise Exposure to Children: Considerations for the National Children's Study. *J Preg Child Health* 1, 105.
- Viola, G.G, Rodrigues, L., Americo, J.C., Hansel, G., Vargas, R.S., Biasibetti, R., Swarowsky, A., Goncalves, C.A., Xavier, L.L., Achaval, M., Souza, D.O. & Amaral, O.B. (2009). Morphological changes in hippocampal astrocytes induced by environmental enrichment in mice. *Brain Res.* 1274, 47–54.
- Volterra, A. & Meldolesi, J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 626–40.
- Wachman, E.M. & Lahav, A (2010). The effects of noise on preterm infants in the NICU. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 96, F305–F309.
- Wahlqvist, M.L. (2013). Antioxidant relevance to human health. *Asia Pac J Clin Nutr* 22 (2), 171-176.
- Wall, P. (2001). Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25 (3), 275–286.
- Walsh, R.N. & Cummins, R.A. (1976). The Open-Field Test: A Critical Review. *Psychological Bulletin* 83, 482-504.
- Wang XM<sup>1</sup>, Wu H, Jiao J, Li YH, Zhang ZR, Zhou WH, Yu SF (2016). Influencing factors for hearing loss in workers exposed to noise in a cement plant. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 34 (12), 895-899.
- Wang, S., Yu, Y., Feng, Y., Zou, F., Zhang, X., Huang, J., Zhang, Y., Zheng, X., Huang, X., Zhu, Y. & Liu, Y. (2016) Protective effect of the orientin on noise-induced cognitive impairments in mice. *Behavioural Brain Research*, 296, 290-300.
- Wang, X. (2004) The unexpected consequences of a noisy environment. *Trends Neurosci.* 27 (7), 364–366.
- Wang, X. (2004). The unexpected consequences of a noisy environment. *Trends Neurosci.* 27(7), 364-366
- Wang, X. (2004). The unexpected consequences of a noisy environment. *Trends Neurosci.* 27(7), 364-366.

- Wang, Y., Hirose, K. & Liberman, M.C. (2002). Dynamics of noise induced cellular injury and repair in the mouse cochlea. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 3, 248–268.
- Weydert, C.J & Cullen, J.J. (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in culture cells and tissue. *Nature protocols.* 5(1), 51-66.
- WHO Regional Office for Europe . Burden of Disease from Environmental Noise: Quantification of Healthy Years Life Lost in Europe. Copenhagen: World Health Organization (2011)
- WHO Regional Office for Europe . Night Noise Guidelines for Europe. Copenhagen: World Health Organization Europe (2009).
- Widen, S.E., Båsjö S, Möller C, Kähäri K (2017). Headphone listening habits and hearing thresholds in swedish adolescents. *Noise Health.* 19 (88), 125-132.
- Will, B. E., Rosenzweig, M. R., Bennett, E. L., Hebert, M. & Morimoto, H. A (1977). Relatively brief environmental enrichment aids recovery of learning capacity and alters brain measures after postweaning brain lesions in rats. *J. Comp. Physiol. Psych.* 91, 33–50.
- Williamson, L.L., Chao, A. & Bilbo, S.D. (2012). Environmental enrichment alters glial antigen expression and neuroimmune function in the adult rat hippocampus. *Brain Behav. Immun.* 26 (3), 500-510.
- Wright, J.W., Murphy, E.S., Elijah, I.E., Holtfreter, K.L., Davis, C.J., Olson, M.L., Muhunthan, K. & Harding, J.W. (2004). Influence of hippocampectomy on habituation, exploratory behavior, and spatial memory in rats. *Brain Res.* 1023, 1-14.
- Wright, J.W., Murphy, E.S., Elijah, I.E., Holtfreter, K.L., Davis, C.J., Olson, M.L., Muhunthan, K. & Harding, J.W. (2004) Influence of hippocampectomy on habituation, exploratory behavior, and spatial memory in rats. *Brain Res.* 1023, 1–14.
- Wu, X., Balesar, R., Lu, J., Farajnia, S., Zhu, Q., Huang, M., ... Swaab, D. F. (2017). Increased glutamic acid decarboxylase expression in the hypothalamic

- Xi, M.C., Woody, C.D. & Gruen, E. (1994). Identification of short latency auditory respon-sive neurons in the cat dentate nucleus. *Neuroreport* 5 (13), 1567–1570.
- Yamane, H., Nakai, Y., Takayama, M., Iguchi, H., Nakagawa, T., Kojima, A., 1995. Appearance of free radicals in the guinea pig inner ear after noise-induced acoustic trauma. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 252, 504-508.
- Yamashita, D., Jiang, H.Y., Schacht, J. & Miller, J.M. (2004). Delayed production of free radicals following noise exposure. *Brain Res.* 1019 (1-2), 201-209.
- Yamasoba, T., Harris, C., Shoji, F., Lee, R.J., Nuttall, A.L. & Miller, J.M., (1998). Influence of intense sound exposure on glutathione synthesis in the cochlea. *Brain Res.* 804, 72-78.
- Yang, Z., & Wang, K. K. W. (2015). Glial Fibrillary acidic protein: From intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends in Neurosciences*, 38(6), 364–374.
- Yatomi, Y., Tanaka, R., Shimura, H., Miyamoto, N., Yamashiro, K., Takanashi, M., Urabe, T. & Hattori, N. (2013) Chronic brain ischemia induces the expression of glial glutamate transporter EAAT2 in subcortical white matter. *Neuroscience*. 244:113-21.
- Yoon, J.H., Won, J.U., Lee, W., Jung, P.K. & Roh, J. (2014). Occupational noise annoyance linked to depressive symptoms and suicidal ideation: a result from nationwide survey of Korea. *PLoS One*. 9(8):e105321.
- Young, D. (1999). Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nature Med.* 5, 448–453.
- Yuste, R. & Katz, L.C. (1991). Control of postsynaptic Ca<sup>2+</sup> influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Neuron* 6, 333–344.
- Zhang, L.I., Bao, S. & Merzenich, M.M., (2001). Persistent and specific influences of early acoustic environments on primary auditory cortex. *Nat. Neurosci.* 4, 1123-1130.
- Zhang, L.I., Bao, S. and Merzenich, M.M. (2002). Disruption of primary auditory cortex by synchronous auditory inputs during a critical period. *PNAS* 99 (4). 2309-2314.

- Zhang, T.Y., Keown, C.L., Wen, X., Li, J., Vousden, D.A., Anacker, C. & Meaney, M.J. (2018). Environmental enrichment increases transcriptional and epigenetic differentiation between mouse dorsal and ventral dentate gyrus. *Nature Communications*, 9, 298.
- Zheng, K.C. & Ariizumi, M.J. (2007). Modulations of immune functions and oxidative status induced by noise stress. *Occup. Health* 49, 32-38.
- Zimmerman, E. & Lahav, A. (2013). Ototoxicity in preterm infants: effects of genetics, aminoglycosides, and loud environmental noise. *J. Perinatol. Off. J. Calif. Perinat. Assoc.* 33, 3-8.

## **9. Abreviaturas**

<b>ABR</b>	Respuesta auditiva del tallo cerebral
<b>AE</b>	Ambiente enriquecido
<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico derivado del cerebro
<b>CA</b>	Test Campo Abierto
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CPF</b>	Corteza prefrontal
<b>CT7</b>	Control de animales expuestos a los 7 días postnatales
<b>CT15</b>	Control de animales expuestos a los 15 días postnatales
<b>DPOAE</b>	Producto de distorsión de emisión acústica
<b>dB</b>	Decibeles
<b>DG</b>	Día gestacional
<b>DPN</b>	Día postnatal
<b>EAAT</b>	Transportador excitatorio de aminoácidos
<b>EI</b>	Test de Evitación Inhibitoria
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GAD</b>	Ácidil glutámico decarboxilasa
<b>GD</b>	Giro dentado
<b>GFAP</b>	Proteína ácida fibrilar glial
<b>HC</b>	Hipocampo
<b>HD</b>	Head Dipping
<b>JN</b>	Jaula normal
<b>LCE</b>	Test Laberinto en Cruz Elevado
<b>NS</b>	No significativo
<b>PC</b>	Periodo crítico
<b>R7</b>	Exposición al ruido a los 7 días postnatales
<b>R15</b>	Exposición al ruido a los 15 días postnatales
<b>RA</b>	Ruido agudo
<b>ROS</b>	Especies reactivas al oxígeno
<b>RS</b>	Ruido Sub-agudo

<b>SAP</b>	Stretched Attend Postures
<b>SEM</b>	Error estándar de la media
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>Trx</b>	Tiorredoxina
<b>UCIN</b>	Unidades de cuidado intensivo neonatales



## **10. Agradecimientos**

A la Dra. Laura Guelman, mi directora, por abrirme las puertas y transmitirme su pasión por la investigación, sus conocimientos y lecciones de vida. Por su compañía, sus consejos y haberme dado todo su apoyo desde el inicio de esta etapa.

A la Universidad de Buenos Aires, por haberme brindando el espacio, los recursos y la formación profesional a lo largo de todos estos años.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por haberme otorgado la beca doctoral, la cual me ayudó económicamente a lo largo de mi formación científica.

A mi co-director de beca doctoral, el Dr. Francisco Capani, por brindarme el espacio y los recursos para llevar a cabo parte de los experimentos de este trabajo. Y a su equipo, con quienes realicé los trabajos histológicos.

A la Dra. María Eugenia Gómez-Casati, por sus conocimientos, su amabilidad y la buena predisposición para realizar los estudios de potenciales auditivos.

A la Dra. María Zorrilla-Zubilete, por sus enseñanzas, su alegría y brindarme ayuda siempre que lo necesité.

A los licenciados Juan Facundo Morici, Agustín Alonso y Raquel Lottero, y las doctoras Magalí Silberman y Silvina Pérez Martínez por su ayuda y consejos para realizar y optimizar los experimentos.

Al CEFYBO, por brindarme los equipos y un espacio de conocimiento. Y en particular a Eduardo, Enzo y Marcela por el cuidado de los animales.

A todo el personal de la 1ra Cátedra de Farmacología y los becarios con quienes transitó este proceso, por la buena onda, las charlas y el apoyo.

A los colegas y amigos de la Cátedra I de Neurofisiología por el apoyo, y especialmente a la Licenciada Florentina Morello García, por cubrirme cada vez que lo necesité.

A mi amor, Gastón Fernández, por todo el apoyo, la comprensión y el amor incondicional a lo largo de estos años.

A mi familia, y en especial a mis padres, que me acompañaron y alentaron desde el principio.

A todos aquellos que no nombré, amigos y colegas, que me ayudaron de diferentes maneras para que esto sea posible.